



Nanoemulsiones de nistatina para el tratamiento de candidiasis muco-cutáneas

Francisco Fernández Campos

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

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

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized neither its spreading and availability from a site foreign to the TDX service. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service is not authorized (framing). This rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

UNIVERSITAT DE BARCELONA

FACULTAT
FARMACIA

DEPARTAMENT
FARMACIA Y TECNOLOGÍA FARMACÉUTICA

NANOEMULSIONES DE NISTATINA PARA EL TRATAMIENTO DE
CANDIDIASIS MUCO-CUTÁNEAS

FRANCISCO FERNÁNDEZ CAMPOS. 2012

UNIVERSITAT DE BARCELONA
FACULTAT DE FARMÀCIA
DEPARTAMENT
FARMACIA Y TECNOLOGÍA FARMACÉUTICA
INVESTIGACIÓN, DESARROLLO Y CONTROL DE MEDICAMENTOS
2006-2007

NANOEMULSIONES DE NISTATINA PARA EL TRATAMIENTO DE
CANDIDIASIS MUCO-CUTÁNEAS

Memòria presentada per Francisco Fernández Campos per optar al Títol de Doctor per
la Universitat de Barcelona

Ana Cristina Calpena Campmany

Beatriz Clares Naveros

Francisco Fernández Campos

FRANCISCO FERNÁNDEZ CAMPOS. 2012

A todas las personas que
se saben merecedoras de
mi gratitud y cariño,
por todo el apoyo recibido
ahora y siempre.

CAPÍTULO 1.	1
Introducción	
1. Candidiasis	3
1.1. Patogenicidad	3
1.2. Candidiasis superficiales	6
1.2.1. Candidiasis cutáneas	7
1.2.2. Candidiasis bucales	8
1.2.3. Candidiasis vaginales	10
1.3. Candidiasis invasivas	11
1.4. Antifúngicos	12
1.5. Nistatina	17
1.5.1. Propiedades farmacológicas	17
1.5.2. Propiedades físico-químicas	19
1.5.3. Formulaciones de nistatina	20
2. Nanoemulsiones	21
2.1. Selección de los componentes de la nanoemulsión	25
2.1.1. Fase oleosa	25
2.1.2. Tensioactivo	25
2.1.3. Diagramas de fases	27
2.2. Caracterización de la nanoemulsiones	28
3. Piel	30
3.1. Fisiología de la piel	30
3.2. Sistemas de administración transdérmica	32
4. Mucosa oral	35
4.1. Fisiología de la mucosa oral	35
4.2. Sistemas de administración transmucosa oral	38
5. Penetración transdérmica y transmucosa	39
5.1. Factores que influyen en la absorción percutánea	43
5.1.1 Factores biológicos	43
5.1.2. Factores físico-químicos	44
5.2. Ecuaciones que definen las cinéticas de la penetración transdérmica	55
5.2.1. Cuantificación del fármaco en la piel	58
CAPÍTULO 2	61
2. Objetivos y plan de trabajo	63
CAPITULO 3	67
Resumen articulo 1	69
Evaluation of novel nystatin nanoemulsion for skin candidosis infections	71

CAPITULO 4	83
Resumen artículo 2	85
Development and characterization of a novel nystatin loaded nanoemulsion for the buccal treatment of candidosis: ultrastructural effects and release studies.	87
CAPITULO 5	125
5. Discusión general	127
5.1. Formulación y caracterización de nanoemulsiones de nistatina	128
5.1.1. Selección y elaboración de las nanoemulsiones	128
5.1.2. Caracterización de las nanoemulsiones	129
5.1.2.1. Estudio geométrico (TEM y DLS)	129
5.1.2.2. Predicción de la estabilidad a largo plazo.	130
5.1.2.3. Comportamiento reológico	132
5.2. Eficacia antifúngica <i>in vitro</i>	133
5.3. Cuantificación de nistatina	135
5.4. Estudios de liberación	137
5.5. Ensayo de permeación en piel humana	140
5.6. Ensayo de permeación en mucosa oral porcina	141
5.7. Estudio de la ultraestructura de la mucosa oral tras el tratamiento con N2.	145
CAPITULO 6	147
6. Conclusiones	149
CAPITULO 7	151
7. Bibliografía	153
CAPITULO 8	175
Resumen anexo 1	177
Anexo 1. Technological, biopharmaceutical and pharmacokinetic advances: New formulations of application on the skin and oral mucosa	179

NANOEMULSIONES DE NISTATINA PARA
APLICACIÓN EN CANDIDIASIS MUCO-
CUTANEAS

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN

1. CANDIDIASIS

Las especies de *Candida* son hongos dimórficos que pueden adoptar diversas formas celulares: levadura, hifas o pseudohifas (Cannon y Chaffin, 1999). Entre ellas destaca *Candida albicans* ya que es un comensal común en humanos que puede ser encontrado en el tracto respiratorio, gastrointestinal, genitourinario, en piel y en membranas mucosas (Singhi y Deep, 2009). Pero puede convertirse en un patógeno oportunista en casos de inmunosupresión, ancianos, diabéticos, tratamiento antibiótico prolongado, quimioterapia y radioterapia anticancerosa, hospitalización, intervenciones quirúrgicas invasivas y trasplante de órganos (Mohandas y Ballal, 2011; López-Martínez, 2010; Evans y Gray, 2003).

1.1. Patogenicidad

Los factores que hacen que *Candida* no sea patógena son principalmente dos:

- Los relacionados con la microbiota. La superficie de piel y mucosas está colonizada por una microbiota comensal, principalmente compuesta por bacterias y en parte por hongos (Calderone y Fonzi, 2001). Las bacterias ejercen una presión selectiva que limita el crecimiento de otros microorganismos, ya que por un lado limitan el acceso a los nutrientes a los microorganismos minoritarios, por otro lado producen sustancias que limitan el crecimiento de otros microorganismos y por último pueden evitar el acceso de *Candida* a los receptores epiteliales necesarios para sus procesos patogénicos (Martín y cols. 2008).
- Otros de los factores involucrados en la limitación de la patogénesis de *Candida* son los relacionados con la inmunidad tanto humoral como celular (Ferrer, 2000).

El modificación de los factores anteriormente mencionados puede hacer que las *Candidas* se vuelvan patógenas, ocasionando entonces una enfermedad oportunista, produciendo una invasión del tejido subyacente o incluso una patología sistémica (Calderone y Fonzi, 2001) como se comentará posteriormente.

1. INTRODUCCIÓN

Que las *Candidas* se vuelvan patogénicas depende principalmente de dos factores:

- Primeramente la condición del paciente, como se ha comentado anteriormente (inmunosupresión, diabetes...).
- Por otro lado los factores de virulencia del microorganismo.

Lo primero que tiene que ocurrir para que se de lugar la invasión es que el hongo se adhiera a la superficie del epitelio (Figura 1). Este proceso se realiza a través de las adhesinas, glucoproteínas de la membrana del hongo, que se unen a receptores específicos de la célula epitelial (Ferrer, 2000). La adherencia al epitelio se ve incrementada por el aumento de los estrógenos en la mujer, efecto que hace que la candidiasis vaginal sintomática sea hormono-dependiente y se produzca en determinados momentos del ciclo menstrual (Tibaldi y cols. 2009). Una vez adherido el hongo, este empieza a desarrollar hifas (Gow y cols. 2011). Parece ser que la formación de estas es un paso necesario para la invasión del tejido ya que los mutantes de *Candida* no filamentosos no son patogénicos (Lo y cols. 1997). La hifas empiezan a secretar una matriz extracelular de polisacáridos (Niimi y cols. 2010), proteasas y lipasas (Calderone y Fonzi, 2001). La matriz extracelular es responsable de la formación de biofilms (Mohandas y Ballal, 2011).

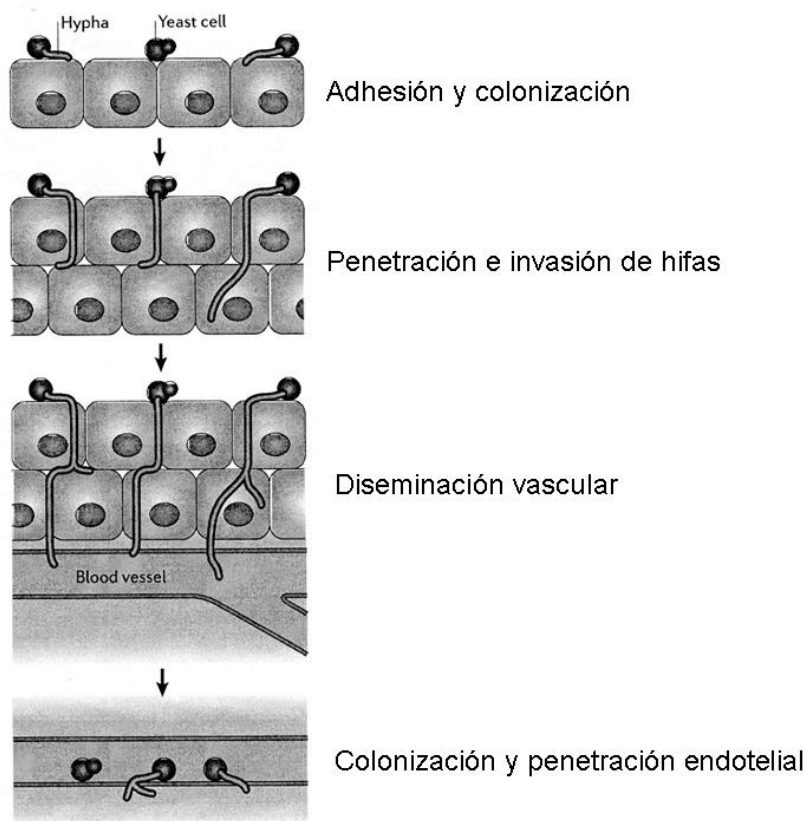


Figura 1. Invasión de tejido por *Candida albicans*.

Siendo estos (Figura 2) comunidades estructuradas de microorganismo que se asocian entre ellos y a una superficie, embebidos dentro de una matriz extracelular protectora (Rautema y Ramage, 2011) y constituyendo un reservorio de patógenos (Ramage y cols. 2009). La formación de estos biofilms dota a la célula de resistencia a antifúngicos. En este sentido la resistencia no sólo se debe a que la exposición a bajas concentraciones de fármaco aumenta la selección de cepas resistentes (Rautema y Ramage, 2011), sino a la dificultad de difusión del fármaco a través de la matriz extracelular (Niimi y cols. 2010). Por otro lado, las levaduras que forman el biofilm producen enzimas (proteasas y lipasas) que son las responsables de la invasión epitelial.

Estos factores hacen necesario la eliminación de los biofilms. Desafortunadamente, no existe otra forma de eliminarlos, que no sea mediante métodos quirúrgicos y/o mecánicos (Stewart y Costerton, 2001).

1. INTRODUCCIÓN

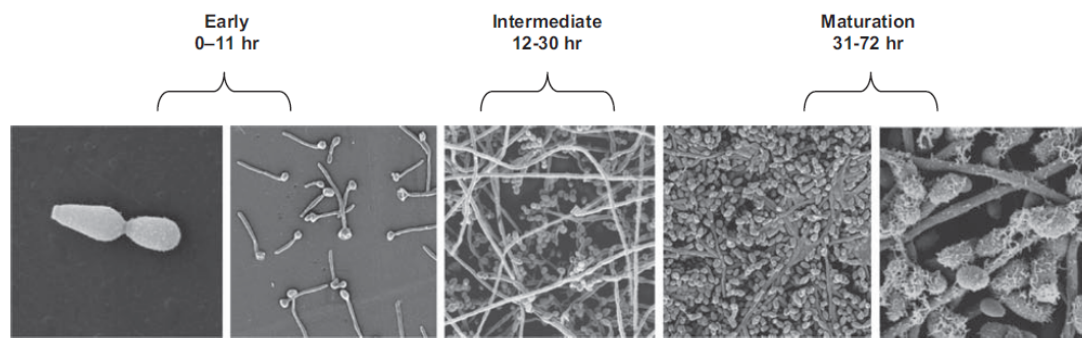


Figura 2. Formación de biofilms por *Candida albicans*. Microscopia de barrido (SEM). Se observa la adhesión y la proliferación de las hifas. (Ramage y cols. 2009)

Otro factor a tener en cuenta incluye los cambios fenotípicos que puede sufrir el hongo debido a diversos elementos ambientales, lo que también contribuirá al aumento de la virulencia, cambiando las interacciones entre las células epiteliales y el hongo (Jayatilake, 2011). Estos cambios fenotípicos no se refieren a la transición entre levadura e hifa, sino a al cambio de la morfología de las colonias (França y cols.2011).

Por último mencionar, que *Candida* puede ser fagocitado por leucocitos polimorfonucleares así como por células epiteliales; estas últimas parecen jugar un papel importante en las infecciones recurrentes actuando como un reservorio, disminuyendo la exposición a antifúngicos y al sistema inmune (Jayatilake, 2011).

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

1.2. Candidiasis superficiales

Las candidiasis muco-cutáneas (piel, uñas y mucosas) es una de las manifestaciones clínicas más comunes en el SIDA (Badiee y cols.2010), sobre todo cuando el recuento de linfocitos CD4 está por debajo de 500 células /mL y es considerado un marcador temprano de infección por HIV. Normalmente a medida que mejora el estatus

inmunológico del paciente a raíz del tratamiento antirretroviral las infecciones fúngicas suelen remitir (Ramos-E-Silva y cols.2010). Por otro lado, como se describe a continuación, existen otros factores de riesgo que predisponen a la infección por *Candida*.

1.2.1. Candidiasis cutáneas

Las infecciones fúngicas cutáneas son producidas mayoritariamente por dermatofitos y por *Candidas* (Chen y Sorrell, 2007), siendo menos frecuentes las infecciones producidas por el género *Malassezia*, *Aspergillus* y *Zigomicetos* (Smolinski y cols.2005). *C. albicans* es una de las especies que más frecuentemente se encuentra en la superficie cutánea (66%), seguido de *C. tropicalis* (20%) (Evans y Gray, 2003). Se estima que las micosis cutáneas afectan en torno a un 20-25% de la población mundial (Abu-Elteen, 1999)

Las zonas cutáneas mas frecuentes de infección por *Candidas* son los pliegues cutáneos, entre los dedos, bajo el pecho y bajo los glúteos, axila y en la ingle (Figura 3). También es responsable de la dermatitis del pañal, sobre todo debido a incontinencia urinaria y/o fecal (Evans y Gray, 2003).



Figura 3. Infecciones cutáneas por *Candida albicans*. (Ramos-E-Silva y cols. 2010).

1. INTRODUCCIÓN

Los factores que predisponen a la infección son la maceración, calor, humedad y obesidad. La oclusión producida por algunos dispositivos médicos (ostomías por ejemplo) y pañales, también pueden predisponer a la infección debido a la maceración de la piel bajo los dispositivos (Woo y cols.2009), esto parece aumentar el pH de la piel de 5.1 a 6.0, y por tanto, la probabilidad de desarrollar candidiasis cutáneas (Evans y Gray, 2003).

Los síntomas más comunes suelen ser erupción, picor, machas de color blanquecino, sensación de quemazón y en ocasiones dolor (López-Martínez, 2010). En casos de inmunodeficiencia la lesión puede evolucionar a úlceras necróticas y pápulas, siendo considerada una lesión fúngica cutánea profunda que puede causar una invasión sistémica (Marcoux y cols.2009; Kaur y Kakkar, 2010).

Un factor de riesgo a sufrir candidiasis cutánea adicional a los comentados anteriormente es una baja edad gestacional y bajo peso al nacer en neonatos, así como un nacimiento vaginal (Katta y cols. 2005). Los neonatos poseen un estrato corneo inmaduro. El proceso de queratinización epitelial se inicia desde la semana 22 gestacional y no termina hasta las primeras semanas de vida postnatal (Smolinski y cols.2005). Así pues estando la barrera cutánea alterada y tras un nacimiento vaginal, el riesgo de infección fúngica cutánea durante los primeros 15 días de vida es elevado (Marcoux y cols. 2009). En estos pacientes la invasión sistémica esta asociada a la colonización cutánea y/o gastrointestinal por *Candida* (Tezer y cols. 2012, Manzoni y cols. 2006). Además, la incidencia de infección por *C. parapsilosis* esta aumentada, a pesar de que *C. albicans* sigue siendo el principal patógeno (Tezer y cols.2012). *C. parapsilosis* a resultado causar una infección menos severa ya que es menos virulento que *C. albicans*, mostrando una menor capacidad de adherencia e invasión al epitelio (Bendel, 2003).

1.2.2. Candidiasis bucales

La boca humana presenta una microbiota muy diversa. La mayoría de microorganismos son bacterias, siendo el número de células fúngicas y el número de especies muy reducido (Niimi y cols.2010). Esta baja concentración de levaduras en la cavidad oral hace que la infección fúngica en la boca sea principalmente oportunista (Samaranayake y cols.2009).

Los hongos pueden ser encontrados por toda la superficie de la mucosa incluyendo dientes, prótesis dentarias, placa dental y saliva (Cannon y Chaffin, 1999).

C. albicans es el hongo mayoritario en la boca (70%), seguido de *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *C. kefyr* y *C. guilliermondii*. Se estima que un 17.7% de la población sana y un 40.6% de los pacientes son portadores de *C. albicans* (Niimi y cols.2010).

La sintomatología oral de candidiasis va desde las grandes placas blancas de la candidiasis pseudo-membranosa en lengua y superficie mucosa (Figura 4 a), hasta lesiones eritematosas palatales de la candidiasis crónica atrófica (Cannon y Chaffin, 1999). La candidiasis esofágica se considera una complicación de una candidiasis oral (Figura 4 b) (Ramos-E-Silva y cols.2010).

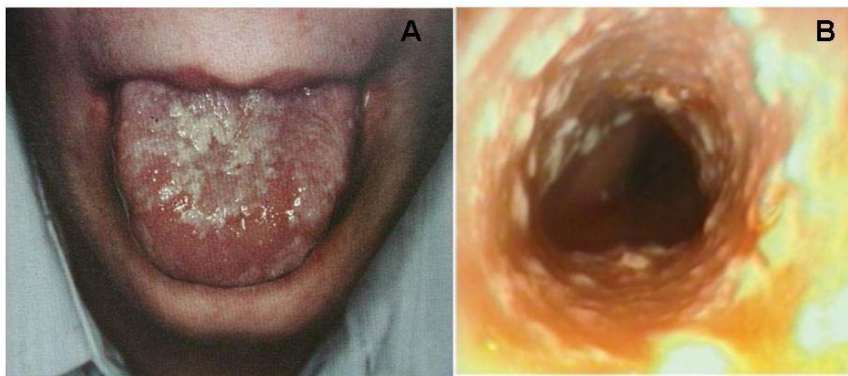


Figura 4. Panel a. candidiasis mucosa oral (Ramos-E-Silva y cols. 2010). Panel b. candidiasis esofágica (Firinu y cols. 2011).

La candidiasis orofaríngea ocurre en más del 95% de pacientes con SIDA y es considerado un importante marcador de enfermedad y de su progresión (Brito y cols. 2011). El amplio uso de agentes antifúngicos para prevenir la ocurrencia de candidiasis en infectados por HIV es en parte responsable de la selección positiva de especies no-*albicans*, así como de la aparición de resistencias (Schorling y cols.2000).

La candidiasis orofaríngea esta altamente relacionada con la mucositis. La mucositis es una patología inflamatoria inducida por tratamientos contra el cáncer, siendo más

1. INTRODUCCIÓN

frecuente en radioterapia (sobre todo tumor de cabeza y cuello) (Rashad y cols. 2009) que en quimioterapia (Worthington y cols.2011). La mucosa oral es especialmente sensible a la radiación debido al elevado recambio celular (turn over).

La mucositis produce dolor, ulceración, alteraciones del gusto, reducción del flujo salival (por esclerosis de glándulas salivares) (Koc y Aktas, 2003), xerostomía y dolor al tragar (Soyas y cols.2004). En estas situaciones, la infección de *Candida*, se ve facilitada debido en parte a la reducción del flujo salivar, alteración del pH de la mucosa bucal y a la neutropenia asociada al tratamiento (Davies y cols. 2006). Aproximadamente entre el 60 y el 90% de los casos afectados de mucositis están infectados por *Candida* (Gligorov y cols. 2011).

1.2.3. *Candidiasis vaginales*

La candidiasis vaginal es una infección muy frecuente entre las mujeres en edad fértil. Tal es así, que la estimación en el diagnóstico y tratamiento de la candidiasis vaginal costó en el año 1995 en Estados Unidos 1.8 billones de dólares (Falagas y cols. 2006).

La infección aguda cursa con prurito, alteración del flujo vaginal, irritación, dispareunia entre otros síntomas (Martins y cols. 2012).

Se estima que un 75% de las mujeres sufren un periodo de candidiasis al menos una vez en su vida y aproximadamente la mitad tiene un segundo episodio (Ferrer, 2000). Alrededor del 5% de los casos la infección toma un curso crónico (cuatro o mas episodios al año) (Beikert y cols. 2011; Sobel, 2005). En estos casos los patógenos principales son *Candida albicans*, especialmente *C glabrata* y suele ser debido al sobre uso de antimicóticos, bajas dosis de mantenimiento de los azoles o tratamiento de dosis única (Sobel, 2007).

En el 80-90% de los casos el agente etiológico responsable es *Candida albicans* ya que este posee una mayor capacidad de adherencia que otras especies de *Candida* (Ferrer, 2000).

Como ya se ha comentado existen diversos factores de vulnerabilidad que facilitan la infección como los relacionados con las hormonas (embarazo, uso de anticonceptivos), uso de antibióticos (tópicos o sistémicos), alteración de la microbiota vaginal (especialmente *Lactobacillus*) y alteraciones inmunitarias entre otros.

Los mecanismos inmunitarios de la mucosa vaginal son característicos, pues son en parte dependientes de estrógenos; ya que estos promueven la producción de citoquinas necesarias para la respuesta de células T frente a *Candida* (Thivolet y Nicolas, 1990). Por otro lado, parece ser que los elevados niveles de estrógenos disminuyen la respuesta de los linfocitos Th1, por lo que puede estar relacionado con la mayor susceptibilidad a candidiasis antes de la menstruación (Wira y cols. 2000). Este es el motivo por el que la inmunidad innata desempeña un papel más importante en la inmunidad de la mucosa vaginal.

1.3. Candidiasis invasivas

No hay que olvidar que tanto la piel como las diferentes membranas mucosas del organismo cumplen una función de protección frente a agentes externos, por tanto las candidiasis muco-cutáneas pueden pasar al torrente sanguíneo y diseminarse en casos en los que la función barrera de piel y mucosa se encuentre alterada, incluso en pacientes inmunocompetentes (Picazo y cols.2008).

De hecho, un tercio de la mitad de los casos de candidemia en España ocurre en la Unidad de Cuidados Intensivos (UCI) (Almirante et. al. 2005). Los pacientes aquí ingresados, pueden presentar alteración de la barrera cutánea, debido a la presencia de heridas, quemaduras, intubación, catéteres vasculares e igualmente condiciones como nutrición parenteral total, diálisis, tratamiento con corticoides, antibióticos de amplio espectro, ventilación mecánica entre otros (Jordà-Marcos et. al. 2007).

Otro factor importante a tener en cuenta en las infecciones fúngicas oportunistas en caso de los pacientes quemados, secundaria al uso de antibioterapia, largos periodos de hospitalización y otras complicaciones derivadas de las quemaduras (Still y cols.1993). La colonización fúngica en estos casos se debe a los microorganismos circulantes por el ambiente o bien a los existentes en el propio tracto gastrointestinal (Mousa, 1999), siendo este el principal reservorio de infecciones por *Candida* (Cannon y Chaffin,

1. INTRODUCCIÓN

1999). La incidencia de candidiasis no relacionadas con la especie *albicans* esta aumentando en estos pacientes (Sarabahi et. al 2011).

Así mismo, aunque en contadas ocasiones, también se puede encontrar neumonía causada por *Candida* en casos de aspiración del contenido orofaríngeo o secundario a una diseminación hematológica de *Candida* desde el tracto gastrointestinal o la piel (Pasqualotto, 2009).

1.4. Antifúngicos

Los fármacos utilizados para el tratamiento de las infecciones fúngicas pueden clasificarse por su estructura en (Mediavilla y Florez, 1997)

1. Alilaminas: terbinafina, naftifina (Figura 5). Bloquea la biosíntesis del ergosterol mediante la inhibición de la escualeno epoxidasa presentando una actividad fungicida frente a dermatofitos y fungistático frente a *C. albicans*. La terbinafina es administrada tanto por vía oral como por vía tópica, en cambio la naftifina se administra únicamente por vía tópica ya que su alta liposolubilidad le permite estar en el estrato corneo hasta una semana tras su aplicación (Kaur y Kakkar, 2010).

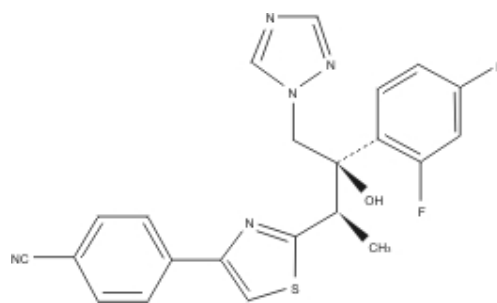


Figura 5. Estructura de terbinafina

2. Hidroxipiridonas: ciclopirox (Figura 6). Es un antifúngico de amplio espectro que se administra únicamente por vía tópica. Se fija a estructuras internas del hongo (membrana celular, ribosomas, mitocondrias) dando como resultado el bloqueo de la absorción de nutrientes por parte de la célula, obteniendo una actividad fungicida (Mediavilla y Florez, 1997).

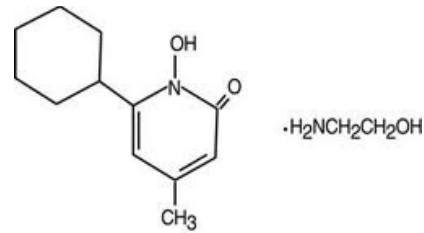


Figura 6. Estructura ciclopirox

3. Morfolinas: Amorolfina (Figura 7). Altera la síntesis del ergosterol resultado en una alteración de la permeabilidad del hongo. Se utiliza únicamente vía tópica, especialmente para el tratamiento de onicomicosis. Es activo frente a dermatofitos y *Candida* entre otros (Mediavilla y Florez, 1997).

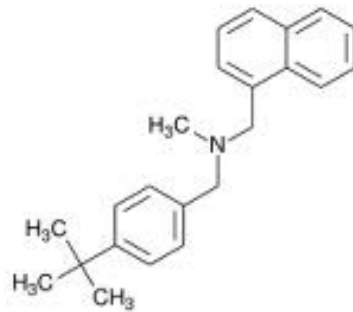


Figura 7. Estructura amorolfina

4. Análogos del ADN: 5-fluorocitosina o flucitosina (Figura 8). Produce una disrupción del ADN. La selectividad por las células fúngicas se basa en que las células mamíferas apenas tienen capacidad para biotransformar la flucitosina en su forma activa, 5-fluorouracilo, que es el que realmente se intercala en el ADN e interrumpe su síntesis (Mediavilla y Florez, 1997). Es activa frente a la mayoría de especies de *Candida* excepto *C. krusei* (Pappas y cols. 2009). Se administra vía oral.

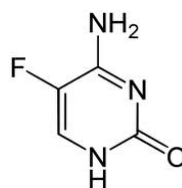


Figura 8. Estructura flucitosina

1. INTRODUCCIÓN

5. Echinocandinas: caspofungina, micafungina y anidulafungina (Figura 9). Son derivados semisintéticos de lipopéptidos cíclicos que inhiben no competitivamente la actividad de la β -(1,3)-glucano sintasa, impidiendo la síntesis de β -(1,3)-glucano, que es el principal componente de la membrana celular (Niimi y cols. 2010). Estos son utilizados vía parenteral, para el tratamiento de infecciones resistentes a otros fármacos.

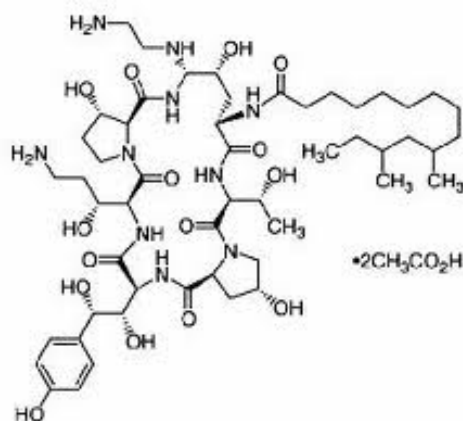


Figura 9. Estructura caspofungina

6. Griseofulvina (Figura 10). Es un antibiótico producido por varias especies de *Penicillium* activo frente a dermatofitos. Presenta actividad fungistático tras fijarse a los microtúbulos del huso mitótico impidiendo así la replicación celular del hongo. A pesar de utilizarse para el tratamiento de infecciones tópicas se administra por vía oral, ya que se adhiere a la queratina que se va produciendo por lo que a medida que va creciendo en nuevo tejido, y reemplazando el infectado, lo hace a la piel resistente al hongo. La efectividad se retrasa varias semanas en función de la tasa de recambio epitelial (Mediavilla y Florez, 1997)

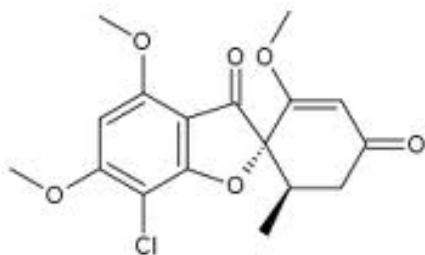


Figura 10. Estructura griseofulvina

7. Azoles: imidazoles (miconazol, clotrimazol, ketoconazol) y triazoles (itraconazol, fluconazol, voriconazol, posaconazol) (Figura 11). Son los antifúngicos más utilizados para el tratamiento de candidiasis muco-cutáneas. Su mecanismo de acción es fungistático y se basa en la inhibición del citocromo p450, el cual está involucrado en la síntesis de la membrana celular del hongo. Inhibe principalmente la 14- α -demetilasa, enzima encargada de la transformación de 14- α -metilesterol en ergosterol, que es uno de los constituyentes más importantes de la membrana del hongo (Figura 12). De esta manera se incrementa la permeabilidad de la membrana alterando el medio celular interno (Ellepola y Samaranayake, 2000). Los imidazoles además interfieren con enzimas oxidativas produciendo una acumulación de intermediarios tóxicos (Akins, 2005), liberación de radicales libres y su consiguiente toxicidad (Ellepola y Samaranayake, 2000). Existen una serie de desventajas en el uso de los azoles para el tratamiento de infecciones fúngicas. Estos poseen un mecanismo de acción fungistático y no fungicida, lo que tiene implicaciones en el tratamiento de infecciones crónicas y pacientes inmunodeprimidos (Siegman-Igra y Rabaw, 1992). Por otro lado, los azoles son fármacos caros, lo que tiene repercusiones de cara al gasto sanitario (Ellepola y Samaranayake, 2000). A estos inconvenientes se unen, los efectos adversos (hepatotoxicidad) y las interacciones con otros fármacos tras su exposición sistémica, debido a que los azoles también interfieren en el mecanismo del citocromo p450 humano (Tezer H, y cols. 2012). Y por último la elevada prevalencia de resistencias a azoles (Kontoyiannis y Lewis, 2002). En muchas ocasiones esta resistencia es responsable de la aparición de candidiasis crónica muco-cutánea, infección persistente, recurrente o refractaria en piel, uñas y membranas mucosas (Firinú y cols. 2011). La aparición de resistencias a los azoles puede ser debida a mutación o sobreexpresión de la enzima 14- α -demethylasa (Lamb y cols. 1997) y/o al incremento en el eflujo del fármaco fuera del organismo (Sanglard D y cols. 1995). Finalmente hay que decir que ciertas especies de *Candida* son menos susceptibles a los azoles de forma innata como es el caso de *C. glabrata* y *C. krusei* (Niimi y cols. 2010).

1. INTRODUCCIÓN

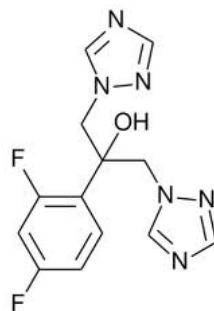


Figura 11. Estructura fluconazol

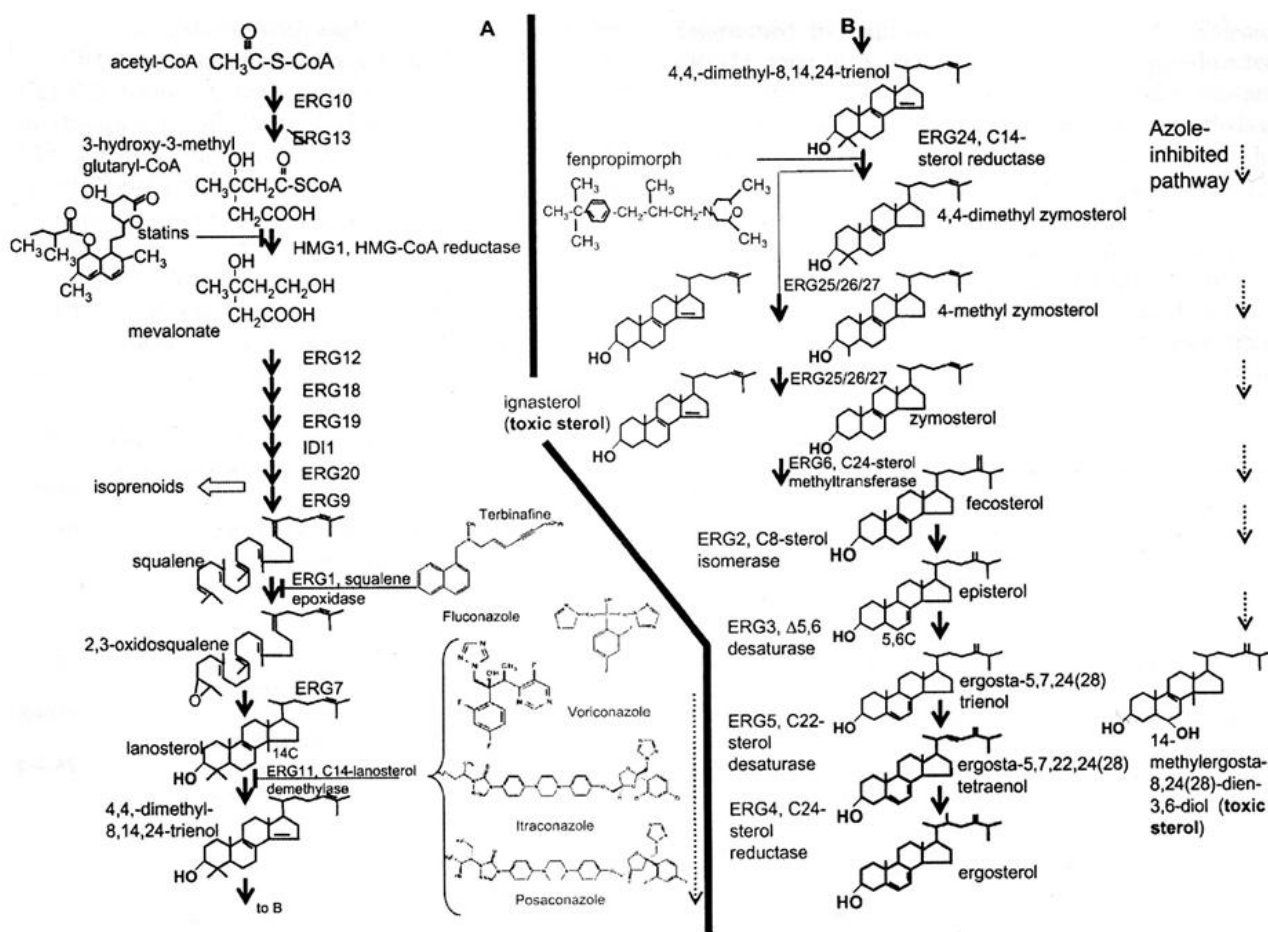


Figura 12. Biosíntesis del ergosterol y sitios de inhibición.

- Polienos: nistatina y Anfotericina B (Figura13). Es la familia de antifúngicos más antigua. La Anfotericina B presenta un amplio espectro frente a numerosas especies de hongo y es el fármaco de elección para el tratamiento de la mayoría

de micosis invasivas siendo administrado vía parenteral (Mediavilla y Florez, 1997). El uso de la nistatina en cambio ha sido relegado a uso tópico exclusivamente. Su mecanismo de acción y demás propiedades están descritas en el siguiente apartado.

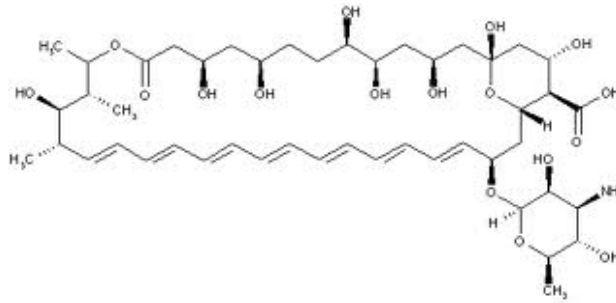


Figura 13. Estructura Anfotericina b.

1.5. Nistatina

1.5.1. Propiedades farmacológicas

Al igual que la anfotericina B, la nistatina es una molécula anfifílica y anfotérico (Croy y Kwon, 2004) que se inserta en las bicapas lipídicas del hongo, uniéndose al ergosterol, formando poros que permiten la salida de potasio del interior teniendo como resultado la muerte celular (Niimi y cols. 2010). No son absorbidos en el tracto gastrointestinal (Indu y Shilpa, 2010).

Los polienos son tóxicos tras su administración intravenosa. Esto es debido a la similitud estructural del colesterol de la membrana humana con el ergosterol de la membrana fúngica de tal manera que se forman poros en la superficie de la nefrona alterando la permeabilidad de la célula humana y causando neurotoxicidad (Zager, 2000). A pesar de ello, la afinidad por el ergosterol, es mayor que por la del colesterol, por lo que se unen de manera más selectiva a la membrana fúngica (Recamier y cols. 2010).

Diversos autores (Croy y Kwon, 2004) observaron que debido a la pobre solubilidad acuosa de la nistatina se forman agregados en las membranas, de aquí la propuesta de incluir la nistatina en formulaciones que permitan su liberación en forma no agregada para así reducir su toxicidad. Bajo esta hipótesis nuevas aproximaciones terapéuticas se han realizado exitosamente para reducir la toxicidad de la Anfotericina B

1. INTRODUCCIÓN

(nefrotoxicidad dosis-dependiente) al incorporarla en formulaciones lipídicas (Tezer y cols.2012). Hoy en día se están realizando esfuerzos para la comercialización de nistatina liposomal (Niotran®, Fase III de ensayo clínico) con el mismo fin, es decir, reducir su toxicidad para poder ser administrado vía intravenosa (Kaur y Kakkar, 2010).

La nistatina es uno de los antifúngicos más utilizados, producido por *Streptomyces noursei* (Kaur y Kakkar, 2010). Es un fármaco con propiedades fungicidas y fungistáticas activo contra una gran variedad de hongos (Woo y cols.2009), pero no frente a dermatofitos (Kaur y Kakkar, 2010). Las resistencias frente a nistatina son raras (Ellepola y Samaranayake, 2000). Una de las ventajas de la nistatina es que presenta un prolongado efecto post antifúngico (PAFE). Este efecto se define como la supresión del crecimiento del hongo que persiste después de una exposición limitada al agente antifúngico (Gunderson et al. 2000). Esta propiedad permite que los antifúngicos con un PAFE prolongado puedan ser administrados con un intervalo de dosificación mayor, sin perder eficacia y con una menor incidencia de efectos adversos (Turnidge y cols.1994). Tal y como se puede observar en la figura 14 el PAFE de los polifenoles es muy elevado, seguido por la 5-fluorocitosina y prácticamente inexistente en los azoles. El PAFE en los polienos se debe al prolongado periodo de tiempo requerido por el hongo para recuperarse de los efectos inducidos en la membrana celular de la levadura (Ellepola y Samaranayake, 1999b). El bajo PAFE de los azoles parece ser debido a que los efectos producidos por el fármaco son temporales y reversibles o bien a que el tiempo de exposición de los azoles es menor al requerido para producir PAFE (Ellepola y Samaranayake, 1998b).

Una única exposición de una concentración de nistatina entre 0.25 y 1 vez el valor de la concentración mínima inhibitoria (MIC) produce un PAFE con una duración media de 3.1 a 6.3 horas en varias cepas de *Candida* (Gunderson y cols. 2000). La nistatina parece tener además un efecto profiláctico ya que es capaz de suprimir la adhesión celular al epitelio mucoso (Ellepola y cols. 1999a) y a las dentaduras (Ellepola y Samaranayake, 1998a) previniendo así la propagación sistémica de la candidiasis oral en pacientes comprometidos. Además, se ha visto como suprime la actividad proteolítica de *Candida* tras su exposición (Wu y cols. 1996).

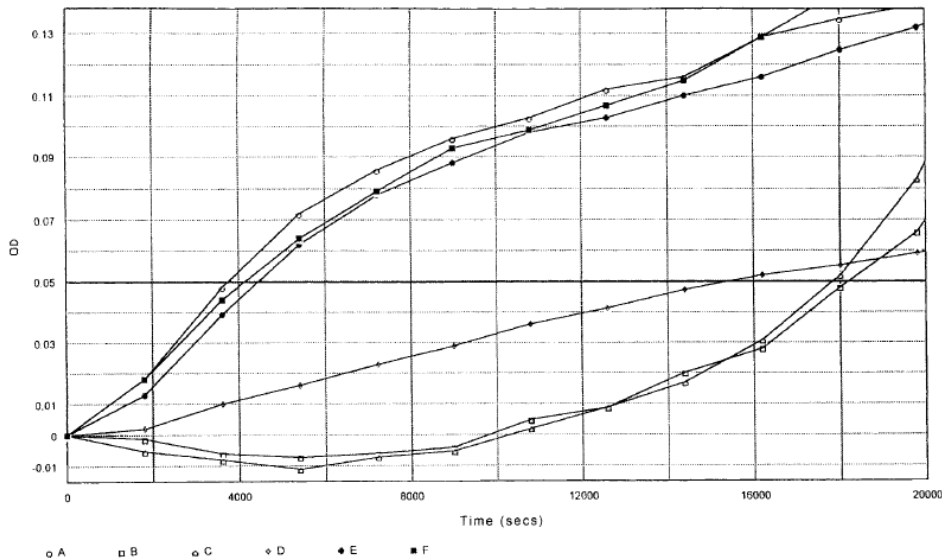


Figura 14: Curva de crecimiento *Candida albicans* seguido de una exposición limitada a antifungicos in vitro (A, Control; B, Nistatina; C, Anfoterizina b; D, 5-Fluorocitosina; E, Ketoconazol; F, Fluconazol). (Ellepolá y Samaranayake, 1998b)

1.5.2. Propiedades físico-químicas

La estructura molecular de la nistatina se presenta en la Figura 15

Formula molecular: $C_{47}H_{75}NO_{17}$

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

Es un polvo amarillo.

Peso molecular: 926.0949 g/mol

LogP: 0.5

Donadores de puentes de hidrogeno: 12

Aceptor de puentes de hidrogeno: 18

Punto de fusión: Se descompone gradualmente a partir de 160°

Solubilidad (mg/ml): agua 0.36, metanol 11.2, etanol 1.2, tetracloruro de carbono 1.23, cloroformo 0.48, benceno 0.28, etilenglicol 8.75.

pKa: 12.65

El oxígeno, la luz y el calor aceleran la descomposición. Soluciones y suspensiones empiezan a perder actividad pronto tras la preparación

1. INTRODUCCIÓN

(Merk index, 1983; PubChem CID 5311331, 2012; <http://www.drugbank.ca/drugs/DB00646>, 2012)

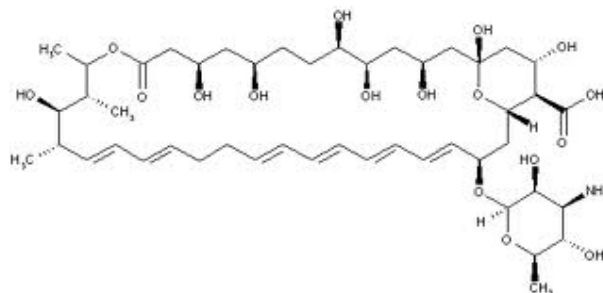


Figura 15. Estructura nistatina

1.5.3. Formulaciones de nistatina

Actualmente solo existe en el mercado una formulación que contenga nistatina en su composición: mycostatin® suspensión oral (100000 UI/mL). El preparado en cuestión posee una elevada concentración de sacarosa, por lo que puede producir caries dentales e impide su uso por parte de diabéticos (que como ya se ha visto anteriormente es un grupo de susceptibilidad para la infección por *Candida*). También contiene etanol, lo cual puede ser irritante, sobre todo en pacientes con mucositis.

Los únicos medicamentos comercializados con nistatina también incluyen otros activos como corticoides y antibióticos (positon®, interderm®, intradermo®) según aparece en la página web de la agencia española del medicamento y productos sanitarios (Febrero 2012).

En cuanto a las formas de dosificación tópicas del mercado, encontramos crema y ungüento. Estos preparados pueden resultar altamente oclusivos y por tanto no convenientes para su uso tópico. Asimismo las asociaciones con otros activos no estarían indicadas para el tratamiento de infecciones cuya etiología sea únicamente de tipo fúngico.

Hoy en día el número de investigaciones que incorporan nistatina en otras formas farmacéuticas ha ido en aumento. El gran interés por la nistatina reside por un lado, en su estructura físico-química y su insolubilidad acuosa, lo que representa un reto para su formulación, siendo un modelo de incorporación de fármacos poco solubles en formulaciones innovadoras. Por otro lado, interesa aumentar el arsenal terapéutico

antimicrobiano, ya que con el creciente número de resistencias del microorganismo, el tratamiento de la infecciones es cada vez mas difícil.

Así se pueden encontrar formulaciones para su administración intravenosa: formulaciones intra-lípido (Semis y cols. 2010), niosomas (El-Ridy y cols. 2011), liposomas (Arikan y Rex, 2001). Formulaciones para su administración oral con una finalidad tópica (tratamiento de candidiasis oro-faríngeas), como geles de quitosan (Aksungur y cols. 2004), comprimidos (de Aguiar y cols. 2010), comprimidos mucoadhesivos (Llabot y cols. 2007; Llabot y cols. 2009; Sakeer y cols. 2010a; Sakeer y cols. 2010b). Formulaciones para administración vaginal: mucoadhesivos (Hombach y cols. 2009).

2. NANOEMULSIONES

La nanoemulsiones son dispersiones coloidales translucidas de dos líquidos inmiscibles estabilizadas por un tensioactivo, con un tamaño de gota comprendido entre los 20 y los 200 nm (Figura 16)

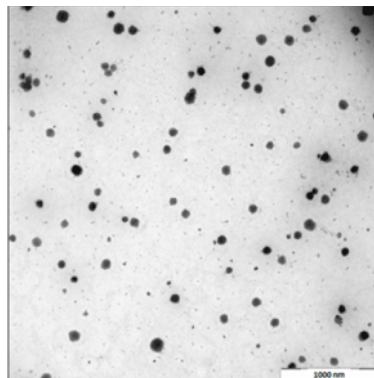


Figura 16. Nanoemulsión.
Microscopía de Transmisión
Electrónica (TEM)

Este pequeño tamaño de gota hace que la nanoemulsión posea una elevada estabilidad cinética, frente al cremado, sedimentación, floculación y coalescencia (Guglielmini, 2008). A pesar de su elevada estabilidad cinética, son termodinámicamente inestables, siendo necesaria la aportación de energía para su formación (Solans y cols.2005). En

1. INTRODUCCIÓN

función de la fuente utilizada para suministrar esta energía podemos distinguir dos métodos de preparación:

- Métodos de alta energía: utiliza homogenización de alta presión, ultrasonidos entre otros, que rompen las gotas de la emulsión. La adición de tensioactivo permite disminuir la energía necesaria para la formación de la nanoemulsión. No obstante, el tensioactivo también puede producir coalescencia de las gotas recién formadas debido a la colisión entre ellas (Guglielmini, 2008). El tamaño de partícula obtenido dependerá del instrumento empleado, así como del tiempo y temperatura utilizado durante la preparación y de los propios componentes de la fórmula (Rao y McClements, 2011). Este método de preparación permite tener un mayor control sobre el tamaño de gota y una mayor variedad de ingredientes disponibles (Ravi y Padma, 2011).
- Métodos de baja energía: también llamados métodos de condensación. Estos aprovechan la energía contenida en el sistema para formar gotas de pequeño tamaño (Solè y cols.2010). La emulsificación se lleva a cabo cambiando los parámetros que afectan al balance hidro-lipófilico del sistema, como la temperatura y composición, por este motivo la selección de los excipientes a utilizar es un paso crítico (Izquierdo y cols.2005). Así se pueden distinguir dos procedimientos: a temperatura constante (variando la composición) o bien a composición constante (variando la temperatura). Este último método también es conocido como método de la temperatura de inversión de fases, siendo el método de baja energía más utilizado (Solans y cols.2005).

Las nanoemulsión pueden clasificarse como de fase externa acuosa (O/W) o de fase externa oleosa (W/O), en función de cuál sea el componente mayoritario de la fase continua en la formulación, agua o aceite, respectivamente (Ravi y Padma, 2011).

Ventajas de las nanoemulsiones sobre otras formas de dosificación (Devarajan y Ravichandran, 2011):

- Aumento de la absorción y disminución de la variabilidad en el tracto gastrointestinal

- Solubilización fármacos tanto lipófilos e hidrófilos
- Aumento de la biodisponibilidad y mejora del perfil fármaco cinético
- Utilización en diversas rutas de administración
- Rápida y eficiente penetración del fármaco
- Enmascaramiento de sabores desagradables
- Protección frente hidrólisis y oxidación del fármaco
- Buena aceptación por parte del paciente
- Requieren comparativamente menos energía para su formación
- Elevada estabilidad cinética
- Se pueden esterilizar mediante filtración

Las nanoemulsiones han sido ampliamente utilizadas en el sector tecnológico, por ejemplo como punto de partida para la realización de nanopartículas, tanto poliméricas (Solans y cols. 2005), como lipídicas (González-Mira y cols. 2011). También se han utilizado ampliamente en el sector cosmético (Guglielmini, 2008), tecnología de los alimentos (Acosta, 2009) y por supuesto como sistemas de liberación de fármacos, permitiendo vehicular fármacos hidrófilos y lipófilos (Zhou y cols. 2009).

La mayor parte de las nanoemulsión han sido utilizadas para su aplicación tópica, ya sea con una finalidad local o sistémica, aunque también se han empleado para su administración intravenosa (Santos-Magalhães, y cols.2000), oral (Nicolaos y cols.2003), ocular (Tamilvanan y Benita, 2004), intranasal (Kumar y cols.2009), pulmonar (Bivas-Benita y cols.2004).

La vía oral sigue siendo la principal ruta de administración de los fármacos en el mercado. Sin embargo presenta importantes limitaciones tales como, el efecto de primer paso hepático o la degradación por las secreciones gastrointestinales, así como la incapacidad para deglutir que presentan la población pediátrica, geriátrica y pacientes no “cooperantes” (Pinto, 2010). La vía oral ha sido ampliamente utilizada para la administración de nanoemulsiones, especialmente en fármacos con una baja solubilidad acuosa como por ejemplo el saquinavir (Vyas y cols.2008). La incorporación de este fármaco en una nanoemulsion consiguió aumentar la biodisponibilidad oral y su distribución hacia el cerebro. La incorporación de paclitaxel en una nanoemulsion O/W también consigue aumentar su biodisponibilidad comparada con la administración oral

1. INTRODUCCIÓN

en solución (Tiwari y Amiji, 2006). Recientemente se ha desarrollado una modificación de nanoemulsiones denominado sistema de liberación de fármacos auto-nano-emulsionante (SNEDDS, Self Nano emulsifying Drug Delivery System), siendo estas, unas bases autoemulgentes, que en contacto con el agua del tracto gastrointestinal forma la nanoemulsión espontáneamente (Rao y cols.2008). En este tipo de formulaciones han sido exitosamente vehiculizados el ramiprilo (Shafiq y cols.2007), permitiendo aumentar su absorción y la ciclosporina (Neoral®) (Devarajan y Ravichandran, 2011) disminuyendo la gran variabilidad intra e inter-individual en la absorción que se observaba en Sandimmune®.

La vía parenteral es una ruta de administración común cuando se requiere un rápido inicio de la acción, cuando los fármacos presentan una muy baja biodisponibilidad (como las proteínas) o un margen terapéutico estrecho. La administración de nanoemulsiones por esta vía también ha supuesto una ventaja, debido también a que son capaces de solubilizar compuestos hidrófobos, debido a su pequeño tamaño, a su capacidad de protección del principio activo del medio y capacidad para el control de la liberación del principio activo (Ravi y Padma, 2011). Se ha administrado por vía parenteral nanoemulsión que contenían talidomida (Araujo y cols. 2011), diversos antitumorales (Ganta y cols. 2010), carbamazepina (Kelman y cols. 2007), entre otros fármacos.

La administración en la mucosa intranasal, se ha realizado en numerosas ocasiones con el fin de liberar el fármaco directamente en el cerebro. Varios autores han realizado aproximaciones en este sentido con el fin de tratar el Alzheimer, migrañas, depresión, esquizofrenia, Parkinson y meningitis entre otras (Kumar y cols.2008; Mistry y cols.2009). Otros autores en cambio han administrado antígenos en nanoemulsión a través de la mucosa nasal con el fin de vacunar frente a diversas enfermedades (Challacombe y cols.1997).

Por otro lado se ha visto que las nanoemulsiones también pueden presentar propiedades biocidas frente a bacterias, hongos y virus debido a su estructura (Ramalingam y cols.2012; Myc y cols.2002).

2.1. Selección de los componentes de la nanoemulsión

Los ingredientes utilizados para la preparación de las nanoemulsiones deben ser seguros, no tóxicos y no irritantes, según los que aparecen en la lista de componentes generalmente reconocidos como seguros (Generally Regarded As Safe, GRAS) (Wu y cols.2001). En este sentido es de especial interés la elección del surfactante, ya que suelen ser los compuestos más irritantes, y se encuentran en una relativamente elevada concentración, necesaria para la estabilización del sistema coloidal.

2.1.1. Fase oleosa: En primer lugar se selecciona la fase oleosa. La fase oleosa es la responsable de la solubilización de fármacos hidrófobos. En este caso es conveniente seleccionar el aceite en el cual el fármaco presente una mayor solubilidad. Así pues para la selección de esta fase, se realiza un screening de aceites. Para evaluar la solubilidad en estos, se disuelve un exceso de fármaco en un volumen determinado, se agita o sonica y se deja en un agitador rotatorio durante 48-72 horas hasta alcanzar el equilibrio. Una vez transcurrido este tiempo las muestras se centrifugan y el sobrenadante es filtrado. Finalmente la concentración de fármaco solubilizado por el aceite es analizado mediante una técnica analítica apropiada (Shakeel y Ramadan 2010).

2.1.2. Tensioactivo: Tras la selección de la fase oleosa se ha de seleccionar el tensioactivo apropiado. Con el fin de racionalizar el comportamiento de los tensioactivos se determinó su balance hidro-lipofílico (HLB). Este tiene en cuenta la contribución relativa del fragmento hidrófilo e hidrófobo en la molécula del tensioactivo. Los tensioactivos con HLB altos (8-18) se consideran solubles en agua, y favorecen la formación de emulsión de fase externa acuosa. Los tensioactivos de bajo HLB (3-6) se consideran lipófilos y favorecen la formación de emulsiones de fase externa oleosa. Los co-tensioactivos, son tensioactivos generalmente alcoholes o ésteres alcohólico de cadena corta, que se añaden con el fin de reducir aun mas la tensión interfacial, facilitando la emulsificación del sistema (Devarajan y Ravichandran, 2011). La adición de un co-tensioactivo, generalmente aumenta la estabilidad del sistema y la solubilidad del compuesto en el mismo (Lu y Gao, 2010).

En general, se eligen tensioactivos no iónicos (ésteres de glicerol, ésteres de ácidos grasos, alcoholes grasos), por su buena tolerabilidad biológica así como por su habilidad para formar nanoemulsiones independientemente del pH y a la concentración de

1. INTRODUCCIÓN

electrolitos en la formula (Djordjevic y cols.2004). También se pueden encontrar tensioactivos aniónicos (ácidos carboxílicos, sulfonatos, etc.) y catiónicos (animas y sales de amonio cuaternario, etc.) (Devarajan y Ravichandran, 2011).

Normalmente las nanoemulsiones contienen grandes cantidades de tensioactivos. Esto hace que posean una muy baja tensión interfacial, facilitando la obtención de tamaños de gota nanométricos que asegura una excelente superficie de contacto entre la piel y el vehiculo (Kreilgaard, 2002).

Para seleccionar el tensioactivo específico se pueden seguir dos procedimientos:

- a. Se seleccionan los tensioactivos y co-tensioactivos en los cuales el fármaco sea mas soluble (Zhu y cols.2008). Por tanto se procede de la misma forma que lo indicado en el apartado 2.1.1.
- b. Selección del tensioactivo que mayor solubilidad tenga en la fase oleosa. La separación de fases es la forma más común de desestabilización de la emulsiones. Ya que son sistemas termodinámicamente inestables, la emulsión tiene a la separación de fases que es la forma menos energética. Los tensioactivos se utilizan con el fin de estabilizar el sistema. En este sentido el tensioactivo seleccionado tendrá una relación directa con la estabilidad del sistema. Para la selección de un tensioactivo específico se puede proceder de la siguiente forma. Se realiza una solución de varios tensioactivo al 15% en agua. Se va añadiendo la fase oleosa seleccionada poco a poco con el fin de poder titularla. Se agita con vortex. Se sigue añadiendo aceite has que la solución se vuelve turbia. Se selecciona el tensioactivo con mayor capacidad de solubilización de la fase oleosa (Shakeel y Ramadan, 2010). Otros autores realizan la selección utilizando métodos turbimétricos (Date y Nagarsenker, 2007). En este caso se realiza una mezcla 1:1 en peso del tensioactivo y el aceite previamente seleccionado. De esta mezcla se toma una parte en peso y se le adiciona la misma cantidad de agua. Las emulsiones se dejan reposar 2 horas y se determina la transmitancia (usando agua como blanco). Se selecciona el tensioactivo que mayor transmitancia posea, reflejando la capacidad emulsificante del tensioactivo. Este método también puede utilizarse para la

selección del co-tensioactivo. En este caso se realiza una mezcla tensioactivo:co-tensioactivo:aceite (2:1:3). Una parte en peso de esta mezcla se diluye con la misma cantidad de agua. La emulsión se deja en reposo dos horas y se evalúa la transmitancia. Se selecciona el co-tensioactivo que mayor valor tenga, reflejando la mayor capacidad emulsificante del co-tensioactivo.

2.1.3. Diagramas de fases: Para determinar con exactitud la composición de la nanoemulsión se realizan diagramas de fases. Los diagramas pseudo-ternarios son mezclas de fase hidrófila, oleosa y mezcla de tensioactivo/co-tensioactivo a un ratio fijo y a una temperatura y presión atmosférica determinada. El ratio (Km) tensioactivo: co-tensioactivo puede ser muy variado. Hay autores que prueban Km desde 1:9 a 9:1, en cambio otros de manera practica prueban tres, uno con una alta cantidad de tensioactivo (6:1, por ejemplo), otro con una alta carga de co-tensioactivo (1:6, por ejemplo) y uno de proporciones iguales (1:1).

Cada vértice del triangulo representa el 100% de uno de los compuestos, mientras que la arista opuesta representa el 0% del mismo (Figura 17).

Para determinar la región de formación de nanoemulsión en primer lugar se seleccionan las mezclas que hayan resultado ser monofásicas y transparentes. A estas se les determina el tamaño de gota y la polidispersión, se dibujan entonces en el triangulo aquella que hayan tenido un tamaño y polidispersión adecuada, generalmente ente 20 y 200 nm y menor a 0.2, respectivamente. Estos puntos se unen y esa área comprende la composición que delimita la región de formación de nanoemulsión. De todos los triángulos probados, se suele seleccionar aquel que tenga un área de nanoemulsión mayor.

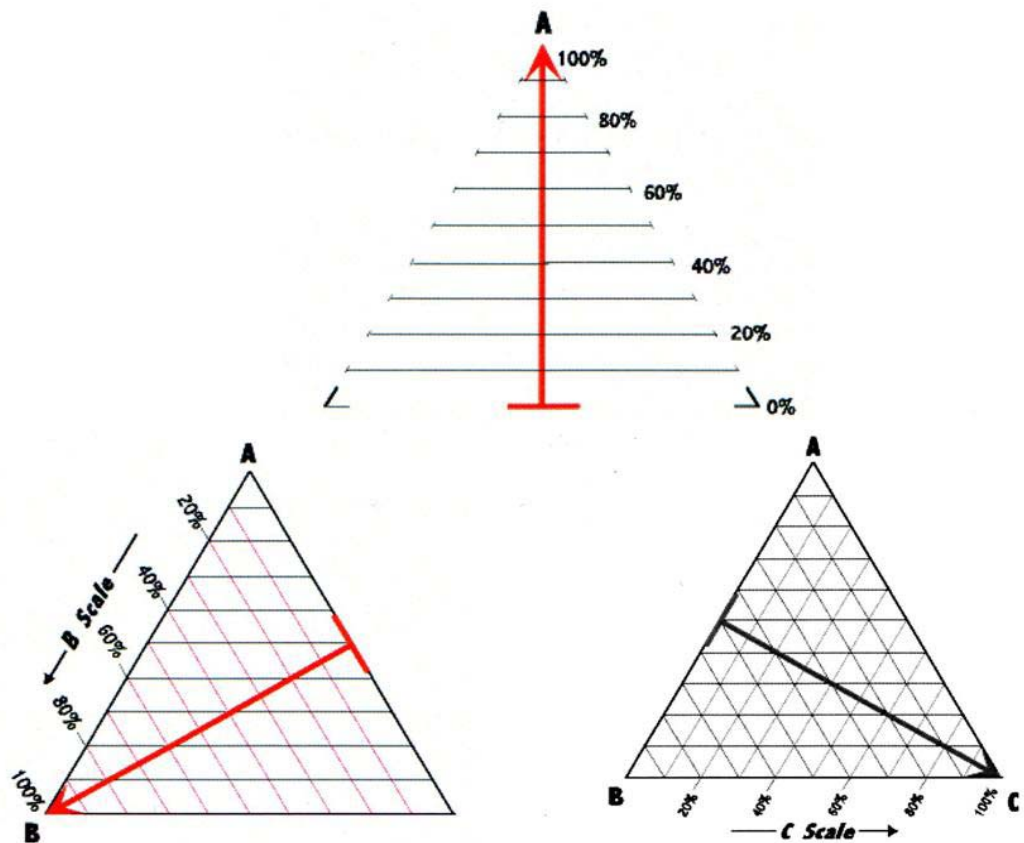


Figura 17. Lectura de un diagrama pseudo-ternario

2.2. Caracterización de la nanoemulsiones

Ya que el tamaño de gota de las nanoemulsiones esta por debajo o muy cerca de la longitud de onda de la luz visible (150nm), la exanimación directa de la nanoemulsión no es posible. Por eso se han de emplear medida indirectas para la evaluación de la estructura de la nanoemulsión Las gotas de fase interna se mueven de forma aleatoria dentro de la fase externa según la ecuación 1 de Stoke-Einstein (Kreilgaard, 2002).

$$D = \frac{K \cdot T}{6 \cdot \pi \cdot r \cdot \eta} \quad \text{Ecuación 1}$$

Siendo D , el coeficiente de difusión; K , la constante de Boltzman; T , la temperatura termodinámica; η , la viscosidad del medio y r , el radio molecular

2.2.1. Conductancia

La nanoemulsiones de fase externa acuosa (o/w) poseen altos valores de conductancia, en contraste con las nanoemulsiones de fase externa oleosa (w/o). Por lo tanto esta

técnica es útil para la determinación del tipo de emulsión obtenido. La adición de un colorante a la nanoemulsión también es útil para determinar cual es la fase externa de la misma. Los colorantes hidrófilos se solubilizaran en el agua de la fase externa acuosa pero no se observara en las gotas de la fase interna oleosa y viceversa (Devarajan V, Ravichandran, 2011).

2.2.2. *Dynamic Light-scattering (DLS) o Espectroscopía de Correlación Fotónica (PCS)*

Es la técnica mas utilizada para medir el tamaño de gota de la nanoemulsión. DLS mide las fluctuaciones de la dispersión dinámica de la luz laser a un ángulo constante en función del tiempo. La intensidad de la luz dispersada depende del tamaño de la partícula, el ángulo de dispersión, el índice de refracción y el medio continuo (Haskell y cols.1998). Como resultado se obtiene el diámetro medio de gota (Z-average) y el índice de polidispersión. Un índice de polidispersión inferior a 0.2 indica que las gotas o partículas son monodispersas.

2.2.3. *Microscopía de Transmisión Electrónica, Transmission electron Microscopy (TEM)*

Esta técnica permite determinar el tamaño de las gotas de la nanoemulsión, así como su morfología. Para poder observar la muestra se ha de realizar un pretratamiento de la misma en función de la técnica específica a utilizar. Al utilizar TEM lo que se hace es una tinción negativa con un metal pesado como el acetato de uranilo. Las zonas donde este se deposita son opacas al haz de electrones por lo que se ven teñidas de oscuro en las imágenes de TEM. El crio-TEM con fractura por otro lado permite la observación directa del sistema. En este caso la muestra se congela rápidamente y se fractura. La superficie de interés se cubre con platino-carbono. La muestra original se elimina por inversión en agua y la replica de metal se observa en el microscopio. A pesar de que el crio-TEM es una buena técnica para la observación de las nanoemulsión, el TEM con tinción negativa representa una buena alternativa a este ya que la morfología de la muestra esta relativamente bien preservada, a pesar de que se puedan observar artefactos (Klang y cols. 2012).

3. PIEL

3.1. Fisiología de la piel

La piel constituye el órgano corporal más extenso que separa al organismo del medio externo. En términos generales la piel realiza funciones de protección mecánica, regulación térmica, equilibrio hídrico, excretora, sensorial, inmunitaria.

Esta formada por tres capas (Figura 18) que desde el exterior al interior son la epidermis, dermis y tejido subcutáneo. Contiene además glándulas sebáceas, sudoríparas y folículos pilosos. La superficie de la piel está normalmente cubierta por una emulsión epicutánea o manto hidrolipídico que se forma a partir de los ácidos grasos de las secreciones sebáceas de los queratinocitos y el agua que proviene de las glándulas sudoríparas. Este coadyuva al mantenimiento de su función protectora y flora cutánea (Montagna, 1961).

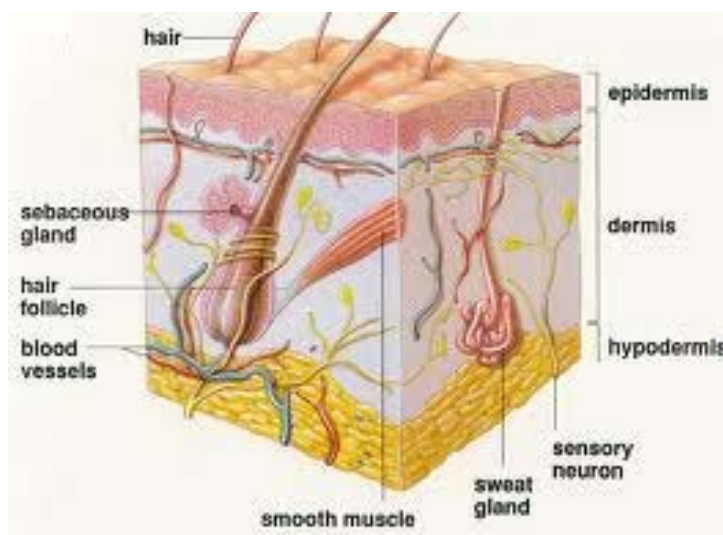


Figura 18. Estructura de la piel humana

3.1.1. La epidermis

Es un epitelio plano estratificado, queratinizado y no vascularizado de un espesor que varía entre 0.02 y 0.2 mm según la zona anatómica. Posee un alto contenido lipídico (colesterol, ceramidas y ácidos grasos) y muy bajo contenido en agua (20-30%). Los queratinocitos al ascender hacia la superficie se vuelven más anchas y aplanadas, perdiendo gradualmente el núcleo y orgánulos y se van enriqueciendo en queratina (Wertz, 1996).

En la epidermis puede diferenciarse cinco estratos:

- Estrato basal o germinativo: es una única capa de células casi cubicas enlazadas entre si por desmosomas y a la lámina basal sobre la que se apoya por hemidesmosomas. Este estrato es el encargado de la regeneración constante del resto de capas celulares epidérmicas por su continua replicación celular. Además de los queratinocitos también se encuentra melanocitos, células de Langergans (relacionados con el sistema inmune) y células de Merkel (del sistema neuroendocrino)
- Estrato espinoso lo forman células que están unidas por puentes intercelulares a modo de espinas con continuidad citoplasmática
- Estrato granuloso esta compuesto por células que contienen gránulos de queratohialina (cuya degradación final produce sustancias higroscópicas responsables de la hidratación natural de la piel. Los gránulos también contienen glicolípidos y esterole. Estos son excretados a medio extracelular, siendo uno de los responsables de la impermeabilidad de la epidermis.
- El estrato lúcido esta ubicado entre la capa granulosa y el estrato corneo. En esta capa las células empiezan a perder los orgánulos celulares por la acción de proteasas y nucleasas.
- El estrato corneo es la parte mas externa de la epidermis y la principal barrera del medio externa, siendo el principal responsable de la impermeabilidad de la piel y la resistencia a la difusión de fármacos o cualquier otra sustancia (Hearnden y cols.2011). Esta formado por células aplanadas altamente queratinizadas, llamada corneocitos, unidos entre si por una sustancia cementante de naturaleza lipídica y estratificada en múltiples capas (Elias, 1983). Estos lípidos intercelulares están compuestos por aproximadamente un 70% de lípidos neutros (esterole libres, 14%; ácidos grasos libres, 19.3%; triglicéridos, 25.2%; estrés de colesterol y esterole grasos, 5.4%; escualeno, 4.8%; alcanos, 6.1%), en un 18% por esfingolípidos (ceramidas y glucosilceramidas), un 5% de lípidos polares (fosfatidiletanolamina, fosfatidilcolina, fosfatidilserina, esfingomielina y lisolecitina) (Lampe y cols. 1983). Esta composición lipídica junto con la constante descamación y

1. INTRODUCCIÓN

renovación el estrato corneo (Tanner T, Marks, 2008) son los principales responsables de la función barrera del estrato corneo.

3.1.2. *La dermis*

Tiene un espesor mayor que la epidermis (1-3mm de grosor). Esta contiene colágeno, elastina, células inmunitarias, fibroblastos, vasos sanguíneos y linfáticos y nervios entre otros muchos componentes, lo que la hace un tejido altamente irrigado y la vía de entrada de fármacos a la circulación sistémica tras haber atravesado el estrato corneo. Posee una matriz amorfa rica en glucosaminoglucanos de alto poder humectante que nutre e hidrata la epidermis. También tienen corpúsculos sensoriales del tacto, dolor y temperatura (Wilkes y cols.1973).

3.1.3. *La hipodermis*

El tejido subcutáneo o hipodermis esta compuesto por tejido graso y fibras elásticas. Se encuentra altamente irrigado y vascularizado. Es el origen de las glándulas sebáceas y de los floculos pilosos. Estos apéndices cutáneos pueden ser importante en el paso de fármacos a circulación sistémica, ya que en estas zonas el grosor del estrato corneo disminuye, pudiendo llegar a desaparecer (Wilkes y cols.1973).

3.2. **Sistemas de administración transdérmica**

Existe un gran número de formulaciones que clásicamente han sido utilizadas para la aplicación tópica (soluciones, emulsiones, ungüentos, lociones, pastas, polvos, etc.). En un primer momento se utilizó para obtener un efecto local en un área específica de la piel, pero en la actualidad la administración de estas formulaciones también persigue obtener un efecto sistémico.

Encontramos numerosos productos en el mercado con esta finalidad, parches para el tratamiento sustitutivo de la nicotina (Gore AV, Chien YW. 1998), anticonceptivos hormonales (Burkman, 2002), analgésicos opioide (Park y cols. 2008), psicoestimulantes como el metilfenidato para el tratamiento del síndrome de déficit de atención (Elia y cols. 2011), lidocaína (Galer y cols. 2004) y antieméticos (Nachum y cols. 2006), entre otros.

De forma general se acepta que la elevada organización cristalina de las lamelas lipídicas desempeña un papel esencial en las propiedades de barrera del estrato córneo. Como se mencionará más adelante, diversas técnicas se han dirigido a perturbar y debilitar la gran organización de los lípidos intercelulares en un intento por mejorar el transporte de la droga a través de la piel intacta o bien para aumentar la fuerza impulsora para la penetración de fármacos. En este sentido uno de las estrategias más estudiadas en la actualidad es el uso de formulaciones nanovesiculares y/o nanoparticulares como sistemas de administración cutáneos.

La justificación del uso de estos sistemas en la administración dérmica y transdérmica de fármacos es múltiple. Por un lado tienen la ventaja de proteger a la sustancia que contienen, aumentando la vida útil del fármaco. Por otro, estos podrían ser potenciadores de la penetración así como depósitos para la liberación sostenida del activo constituyendo una limitación de la absorción sistémica de los fármacos.

Entre los más conocidos, se encuentran, los liposomas. Estos se definen como vesículas microscópicas constituidas por una o varias bicapas fosfolipídicas concéntricas alternando con compartimentos acuosos. Poseen una forma, estructura y tamaño diversos, aunque sus dimensiones suelen oscilar entre 10 nm y varias micras. Dada su constitución, tienen la capacidad de captar una gran variedad de sustancias activas hidrosolubles, liposolubles o anfifílicas. La versatilidad de los liposomas se refleja tanto en su arquitectura como en sus propiedades físicas como la carga superficial, el tamaño, la permeabilidad/rigidez de la pared o su capacidad de carga.

En los últimos años muchas investigaciones ha sido llevadas a cabo para la administración transdérmicas de antibióticos (Manosroi y cols. 2004), antivirales (Dubey y cols. 2010), anestésicos (Shim y cols. 2010) y antiinflamatorios (Clares y cols. 2009) en liposomas.

En un intento por mejorar las propiedades de los liposomas surgen niosomas, etosomas y transfersomas.

Los niosomas son vesículas compuestas de tensioactivos no iónicos. Si se comparan con liposomas convencionales ofertan una mayor estabilidad química y menores costos,

1. INTRODUCCIÓN

Los niosomas de aplicación tópica pueden aumentar el tiempo de residencia de las drogas en el estrato córneo y la epidermis, así como reducir la absorción sistémica del fármaco. Se cree que mejoran las propiedades de la capa córnea, tanto por la reducción de la pérdida de agua transepidérmica como por la reposición de lípidos perdidos de la piel. En los últimos años, la atención se ha centrado en el uso de tensioactivos a base de azúcar por ser menos tóxicos y altamente biodegradable (Choi y Maibach, 2005).

En cuanto a los etosomas, son liposomas con un alto contenido en alcohol (hasta 45%), capaces de mejorar la penetración de activos en los tejidos profundos y circulación sistémica. Precisamente es el alcohol quien fluidifica los lípidos etosomales y lípidos del estrato córneo permitiendo así su penetración (Dubey et. al. 2010).

Mientras que los liposomas son incapaces de atravesar poros menores de 50 nm, transfersomas de hasta 500nm son capaces de penetrar la barrera del estrato córneo espontáneamente. En este caso se habla de vesículas lipídicas ultradeformables, compuestas de fosfolípidos como su principal ingrediente, 10-25% de tensioactivo y 3-10% de etanol (Dubey et. al. 2006).

Como alternativa a otros sistemas como las emulsiones, liposomas o nanopartículas poliméricas en 1990 se desarrollan las nanopartículas lipídicas sólidas (SLN). Son dispersiones acuosas de matrices lipídicas sólidas estabilizadas por tensioactivos. (Müller et. al. 2007). Protegen las moléculas de fármacos susceptibles de degradarse bajo la influencia de agentes externos como la luz y el agua, presentan una mejor biodisponibilidad y podrían ser diseñadas para dar perfiles de liberación prolongada de sustancias activas poco solubles en agua, al incorporarlas en la matriz lipídica sólida. Entre sus desventajas estarían el posible crecimiento de las partículas durante su almacenamiento, la tendencia hacia una gelificación impredecible, la existencia de cambios inesperados en sus transiciones polimórficas y su inherente baja capacidad de incorporación de fármacos limitada por la estructura cristalina del lípido sólido.

Una nueva generación de nanopartículas lipídicas son los Transportadores Lipídicos Nanoestructurados (NLC). Estos sistemas tendrían las mismas ventajas que las SLN sin embargo minimizan o evitan algunos de los inconvenientes anteriormente mencionados,

como la capacidad de carga, segregación durante el almacenamiento y alto contenido en agua de las dispersiones de SLN.

A pesar de las ventajas del uso de liposomas y nanopartículas lipídicas existen inconvenientes respecto a su puesta a punto y estabilidad, lo que obviamente dificulta la preparación y mantenimiento de estos vectores.

Frente a todos ellos, las nanoemulsiones empleadas para la vehiculización tópica o transdérmica de fármacos tienen excelentes características como, diámetro de gota pequeño y distribución homogénea, estructura estable.

4. MUCOSA ORAL

4.1. Fisiología de la mucosa oral

La mucosa oral esta compuesta principalmente por dos capas: el epitelio y el tejido conectivo subyacente (lámina basal, lámina propia y submucosa). Ambas capas están separadas por la membrana basal. (Figura 19 y 20) También contiene numerosas glándulas exocrinas, vasos sanguíneos y nervios.

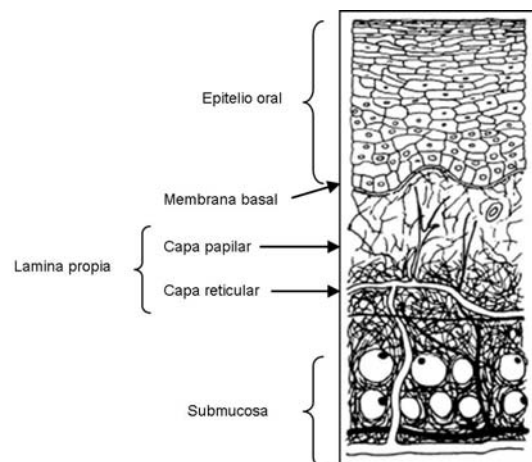


Figura 19. Anatomía de la mucosa bucal con las capas que la conforman

1. INTRODUCCIÓN

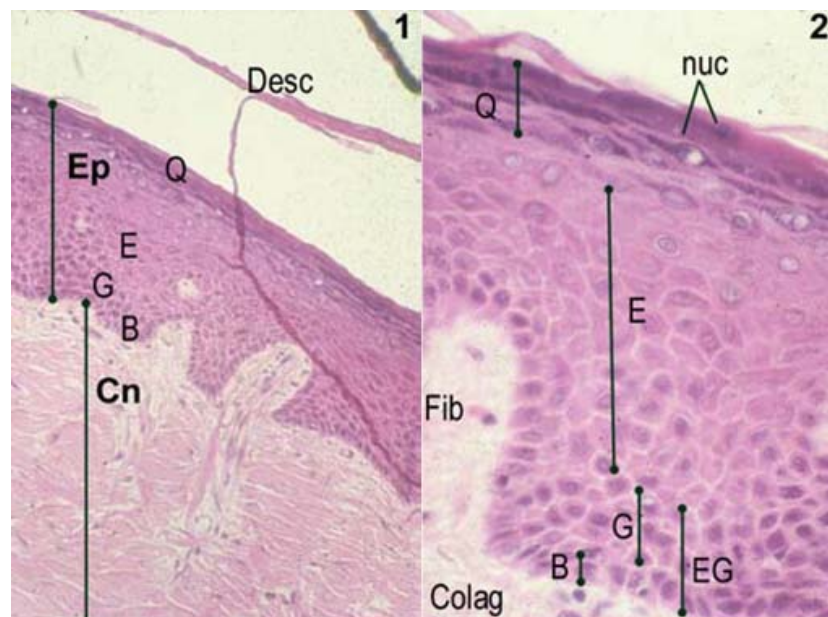


Figura 20. 1) Mucosa bucal constituida por un epitelio (Ep) de recubrimiento y por tejido conectivo (Cn) laxo que lo sostiene y nutre, denominado córium o lámina basal. 2) Muestra desde el interior hacia la superficie de la mucosa, la capa basal (B) de aspecto poliédrico y más oscuro (basófila), que es la zona donde tiene lugar la replicación celular activa. Finalmente se encuentra la capa espinosa (E).

En la mucosa oral pueden observarse dos tipos de epitelio, queratinizado, con un alto contenido en ceramidas y acilceramidas (que se encuentra en la superficie masticatoria: paladar duro y encías) y no queratinizado, sin acilceramidas y con bajo contenido en ceramidas (paladar blando, superficie ventral de la lengua, suelo de la boca y mejillas) (Patel y cols.2011). Se estima que el grosor del epitelio de la mucosa bucal es de 500-800 μm (500-600 μm en su parte no queratinizada), posee una tasa de recambio celular de 5-7 días, una superficie total de 50 cm^2 y un flujo sanguíneo de 20.3 $\text{ml}/\text{min}/100 \text{ g}$ tejido aproximadamente (Sudhakar y cols.2006).

Por otro lado, la mucosa sublingual posee un espesor de 100-200 μm , posee una tasa de recambio celular de 20 días, una superficie total de 26 cm^2 y un flujo sanguíneo de 12.2 $\text{ml}/\text{min}/100 \text{ g}$ tejido aproximadamente (Patel y cols.2011).

En las capas celulares más superficiales el epitelio se pueden observar gránulos membranosos que parecen fundirse con la membrana de la célula epitelial, expulsando

los lípidos que contienen al espacio extracelular. Estos gránulos son esféricos de unos 0.2 μm (Sudhakar y cols.2006).

La saliva es otra barrera del organismo para la administración de los fármacos, ya que el flujo de saliva es en parte responsable del periodo de permanencia del principio activo en la cavidad oral. Está compuesto principalmente por agua, sales minerales y algunas proteínas (amilasa, lisozima, albumina). Se estima que la producción de saliva es de aproximadamente 1-1.5 litros al día (1-2 ml/min) (Sudhakar y cols.2006), aunque esta es variable.

El pH de la mucosa bucal es de 6-7.4 (Patel y cols.2011).

En cuanto al moco, es otro componente que puede afectar a la liberación del fármaco en la mucosa oral. Su espesor varía entre 50 a 400 μm . Su función es fundamentalmente la lubricación y protección de las células epiteliales de agresiones de tipo mecánico o químico. El mucus está formado por mucinas (glicoproteínas de alto peso molecular ($2-14 \times 10^6$ Da), capaces de formar un gel viscoelástico. El contenido de agua es del 95% aproximadamente. Además el moco es muy rico en ácido siálico y residuos de sulfato, por lo que a pH fisiológico se encuentra cargado negativamente, jugando un papel clave en la mucoadhesión (Rodríguez y cols. 2000).

Independientemente del grado de queratinización de la mucosa oral, esta no posee un estrato corneo propiamente dicho por lo que es mucho más permeable que la piel, de 4 a 4000 veces más permeable (Galey y cols. 1976). La barrera de difusión de fármacos en la mucosa oral se debe principalmente al contenido lipídico de las capas superficiales del epitelio. Estos lípidos son secretados al medio intercelular en forma de desmosomas y gránulos membranosos, asegurando así la cohesión del epitelio (Shojaei, 1998). La composición de estos lípidos es aproximadamente 76% de fosfolípidos, 23% de glucoesfingolípidos y un 0.7% de ceramidas (Sudhakar y cols. 2006). Estos lípidos dificultan el paso de fármacos hidrófilos, pero el alto grado de hidratación del tejido conectivo dificulta el paso de fármacos lipófilos. La permeabilidad de la mucosa oral se encuentra todavía más incrementada en la mucosa enferma (liquen plano, ulceraciones u otras) (Sankar y cols. 2011).

4.2. Sistemas de administración transmucosa oral

Hoy en día existen numerosas formulaciones para la aplicación en la cavidad bucal como sprays, comprimidos, colutorios, pastas, films y parches.

Se estima que el tiempo de residencia de un sistema de administración transbucal en la mucosa oral es de aproximadamente 4-6h (Alur y cols.2001).

En el mercado, existen comprimidos destinados a la absorción transmucosa de fentanilo (Actiq®, USA) y nitroglicerina (Nitrogard®, USA) transmucosa (Madhav y cols.2009). Estos comprimidos se disuelven en la saliva, utilizando toda la superficie bucal para la absorción. Los inconvenientes que poseen estos sistemas son su corto tiempo de residencia en la boca, variaciones en la producción de saliva y dificultan la deglución de la forma farmacéutica hasta el tracto gastrointestinal. Con el fin de aumentar el tiempo de residencia se han desarrollado comprimidos mucoadhesivos, en lo que se incorpora miconazol (Loramyc®, Francia) entre otros fármacos (Lalla y Bensadoun, 2011).

La nitroglicerina se haya comercializada también en forma de spray sublingual (Glytrin Spray®, UK) para el alivio rápido de la angina de pecho. Igualmente también se encuentra comercializados en este formato un spray de insulina (Oral-lyn spray®, USA, India), flurbiprofeno (Benactiv®, Italia), nicotina (Nicotrol®, USA) (Hearnden y cols.2011).

Los colutorios se han centrado principalmente en el tratamiento con antimicrobianos de acción local. Ejemplos ampliamente conocidos como colutorios a base de clorhexidina, que pueden llegar a tener un efecto antibacteriano de hasta 7 horas tras la administración (Cousido y cols.2010).

El empleo de los geles se restringe principalmente a aquellos que tienen propiedades mucoadhesivas para aumentar el tiempo de residencia en la cavidad bucal, al igual que los comprimidos tienen la desventaja de que el fármaco puede ser deglutido al poseer una zona de difusión en todos los lados de la formulación. En la literatura se puede encontrar numerosas investigaciones de liberación de fármacos desde geles orales como analgésicos (Alsarra y cols.2007), antihipertensivos (Save y cols.1994), protectores de la mucosa (Innocenti y cols.2002), etc.

Las pastas se han reservado para la liberación intra-canal de antimicrobianos en endodoncias. Adicionalmente puede encontrarse triamcinolona en Orabase® (Oralene®, USA), una pasta mucoadhesiva (Hearnden y cols.2011). También se ha investigado la incorporación de liposomas con corticoides en pastas orales (Erjavec y cols.2006).

Existen principalmente tres tipos de parches oro-adhesivos (Madhav y cols. 2009). En primer lugar aquellos que poseen una matriz capaz de disolverse en la cavidad oral, de tal forma que liberan el fármaco totalmente de forma sostenida y por tanto no es necesario retirar ningún resto del dispositivo. Por otro lado, se encuentran parches que no se disuelven. Poseen una única superficie de difusión, gracias a la presencia en su estructura de una película protectora de la saliva. Como inconvenientes habría que destacar una pequeña área de difusión, limitando la dosis a administrar así como los restos del dispositivo que tras el tratamiento deben ser retirados por el paciente. Por último nos encontramos con los parches con una cubierta impermeable, los cuales son capaces de disolverse completamente sin dejar residuos.

Los films son laminas poliméricas capaz de disolverse en la lengua en menos de 30 segundos permitiendo su paso a través de la barrera epidérmica y su rápida llegada a la circulación sistémica. Se han investigado para el tratamiento de patologías como la impotencia, migrañas, mareos, dolor y nauseas (Hearnden y cols.2011).

5. PENETRACION TRANSDERMICA Y TRANSMUCOSA

El efecto de los medicamentos aplicados tópicamente puede ser de dos tipos: *Tópico y/o Sistémico*. Así pues tras la administración de un activo sobre la piel o mucosa este puede ejercer su efecto solamente en los tejidos locales o capas más superficiales y/o en cualquiera de los tejidos del cuerpo como si su aplicación fuese por vía oral o parenteral. Por tanto, la administración transdérmica o transmucosa de fármacos representa una vía de administración alternativa más práctica, segura y menos invasiva que las vías convencionales de administración basadas en el uso de agujas o formas farmacéuticas sólidas orales.

1. INTRODUCCIÓN

A pesar de que la de administración transdérmica o transmucosa de principios activos no ha sido todavía explotada, sus ventajas potenciales respecto a otras vías de administración son innumerables, entre ellas:

- Evita el tracto gastrointestinal y la biotransformación del efecto de primer paso hepático
- Liberación en un lugar específico
- Control del porcentaje de absorción
- Puede formularse como un compuesto de liberación retardada
- Proporciona una dosis constante
- Reduce los efectos secundarios sistémicos
- Fácil aplicación. Mejora el cumplimiento por el paciente
- Permite que se hallen concentraciones sustanciales del fármaco en el interior de los tejidos blandos del lugar de aplicación
- Superficie fácilmente accesible (posibilidad de controlar y/o eliminar la forma farmacéutica).

Estas ventajas son especialmente útiles en el caso de fármacos susceptibles de degradarse en el tracto gastrointestinal, fármacos usados en tratamientos crónicos, o fármacos utilizados en terapias de reemplazo.

Además tanto la piel y la mucosa oral son vías de administración muy popular, debido a su buena accesibilidad y una elevada aceptación por parte del paciente (Hearnden y cols. 2011). Además están expuestas de forma rutinaria a diferentes compuestos y estrés mecánico, por lo que se presupone como robustas y menos sensibles a irritación por parte del fármaco, forma farmacéutica, uso de promotores de la absorción, etc, que otras vías.

No obstante, se deberá tener en cuenta que tanto en piel como en mucosa también existe metabolismo (Goebel y cols.2009), y aunque su carga metabólica es mucho menos que la hepática, puede ser un inconveniente para la administración de determinados fármacos por estas vías. Por otro lado, la gran variedad de microorganismos presentes en piel y en mucosas también pueden alterar algunos fármacos (Yamahara y Lee, 1993).

Como ventaja de la vía transmucosa oral frente a la transdérmica se puede decir que es mas permeable, mas vascularizada, menos sensible a materiales alergénicos e irritantes y posee una mayor hidratación que permite la solubilización del fármaco. Estos factores hacen que la mucosa oral sea una vía de administración interesante para fármacos que requerían un rápido inicio de la acción a nivel sistémico (Sankar y cols.2011).

Una consideración a tener en cuenta, son las zonas limites entre piel y mucosa, como labios, piel peri-ocular, peri-anal y peri-genital. Estos poseen características intermedias a las anteriormente citadas. El estrato corneo en esta zonas es mas delgado, por tanto mas permeable.

Se considera que la mayoría de fármacos atraviesan la piel o mucosa por difusión pasiva, a pesar de que diversos autores observaron el transporte activo de algunos fármacos. Los procesos implicados en el paso del fármaco por vía transdérmica o transmucosa comprenden tres pasos (Figura 21). Primeramente la liberación del fármaco del vehiculo que lo contiene hasta la interfase piel/vehiculo. Una vez aquí el fármaco penetra por las capas mas externas, hasta las internas, pudiendo llegar a la circulación sistémica (Lu y Gao, 2010).



Figura 21. Esquema de los procesos implicados en la penetración dérmica.

1. INTRODUCCIÓN

El paso del fármaco a través de la piel puede producirse por dos rutas principales (Figura 22):

- Ruta transepidérmica. Esta es la vía más importante en la penetración cutánea. Se produce por difusión intercelular o intracelular. La vía intercelular es de naturaleza fundamentalmente lipídica (Elias y cols. 1981), por lo que el fármaco pasa a través de la matriz lipídica entre los corneocitos del estrato corneo. Los fármacos lipófilos difunden a través de estos lípidos extracelulares y los más polares a través de la parte hidrófila de dichos lípidos. En la vía intracelular el fármaco pasa a través de los corneocitos, salvando repetidos repartos entre el principio activo y las regiones hidrófilas y lipófilas de las bicapas lipídicas. Esto hace que el paso del fármaco a través de esta vía se amenos importante. Los compuestos apolares penetran por difusión a través de los lípidos intracelulares, mientras que lo polares lo hacen a través de la queratina hidratada presente en los queratinocitos.

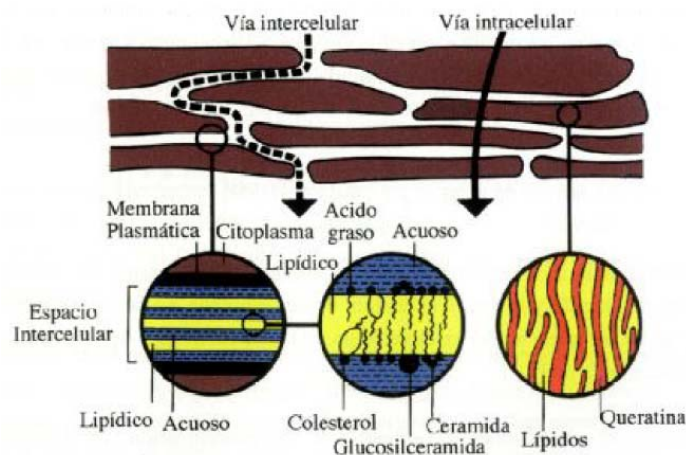


Figura 22. esquema de la rutas de paso del faramco a traves de la piel.

- Ruta apendicular, cuando el fármaco pasa a través de glándulas sudoríparas, sebáceas o a través de los folículos pilosos. Esta vía de entrada es mas rápida que las anteriores aunque se considera una ruta minoritaria. Aproximadamente el 1% de la superficie corporal esta cubierta por orificios porosos (Tanner y Marks, 2008).

La difusión del fármaco a través del epitelio bucal (Salamat-Miller y cols. 2005) se puede realizar de igual forma mediante tres mecanismos:

- Difusión pasiva transcelular o paracelular
- Transporte facilitado
- Endocitosis/exocitosis

5.1. Factores que influyen en la absorción percutánea

5.1.1 Factores biológicos:

- a. Edad: Debido a la variabilidad interindividual en los parámetros de permeación, los resultados de los estudios son poco concluyentes. Únicamente se puede afirmar que la piel de niños y recién nacidos así como la de ancianos es más permeable que la del adulto (Bonina y cols.1993).
- b. Zona corporal. Existen grandes variaciones intraindividuales en función de la zona corporal (Wester y Maibach, 1999). El área menos permeable para el paso de sustancias es la planta del pie (grosor estrato corneo 600 μm), seguido de los tobillos y la palma de la mano (grosor estrato corneo 400 μm). El antebrazo y la espalda presentan una permeabilidad mayor, seguida de cuero cabelludo, axilas y frente. Las zonas más permeables resultaron ser el ángulo de la mandíbula y la piel del escroto (grosor estrato corneo 5 μm) (Scheuplein y Blank, 1971).
- c. Estado de la piel: Existen determinadas patologías que afectan al estado de la piel, pudiendo alterar su función barrera y de esta forma aumentar la permeabilidad de la misma a xenobiótico, fármacos, microorganismos. La permeabilidad aumenta en casos de descamación cutánea, agresión química o física, e inflamación.
- d. Grado de hidratación del estrato corneo: si aumenta el contenido de agua la permeabilidad de los fármacos aumenta (Idson, 1975), como se vera en el efecto oclusivo. Cuando el nivel de hidratación es menor al 10% se considera que la queratina esta deshidratada, se produce descamación del estrato corneo y se altera la absorción.

1. INTRODUCCIÓN

- e. Flujo sanguíneo: Al aumentar el flujo sanguíneo, el tiempo de residencia del fármaco en la dermis disminuye y aumenta por tanto el gradiente de concentración, favoreciendo el paso del fármaco de la superficie cutánea a la dermis. Si el flujo sanguíneo de la zona es bajo o disminuye, la sustancia no puede difundir a medida que penetra, convirtiéndose en un factor limitante para la absorción del fármaco (Barry, 1983).
- f. Factores ambientales: Relacionado con el flujo sanguíneo, se podría citar el efecto vasoconstrictor que la disminución de la temperatura ambiental tiene sobre la superficie de la piel y la consecuente disminución de la permeabilidad. Como las forma tópicas se suelen aplicar bajo un ligero majase, esto hace una aumento del flujo sanguíneo local y favorece la absorción del fármaco.

5.1.2. Factores físico-químicos:

- a. Criterios relacionados con el fármaco:
 - Coeficiente de reparto: el coeficiente de reparto octanol/agua (logP) es uno de los factores más importantes para la penetración del fármaco a través del epitelio y puede ser utilizado para predecir el reparto en la piel. El logP y el reparto en la piel mantienen una relación parabólica (Kim y cols.2000). De tal forma que los compuestos con un bajo logP presentan una baja permeabilidad debido a su bajo reparto con los lípidos de la piel (tienden a quedarse en el vehiculo), sin embargo los fármacos con un logP elevado (que facilita la salida del fármaco del vehiculo hacia la piel) también poseen una baja permeabilidad por su incapacidad de reparto fuera del estrato corneo (que quedaría retenido en este). Se acepta que la máxima permeación se consigue con un logP entre 1 y 3 (Thomas y Finnin, 2004), La ley de Fick establece una proporcionalidad entre el flujo del fármaco a través de la piel y el coeficiente de reparto entre el vehiculo y la piel.
 - Coeficiente de difusión. Expresa la velocidad de difusión de un compuesto en un determinado medio. Si se considera que las moléculas de fármaco son esféricas, el coeficiente de difusión se puede calcular por la ecuación 1 de Stokes-Einstein.

$$D = \frac{K \cdot T}{6 \cdot \pi \cdot r \cdot \eta} \quad \text{Ecuación 1}$$

El coeficiente de difusión es inversamente proporcional al tamaño de la molécula. Por tanto los fármacos con un bajo peso molecular son más susceptibles de penetrar a través del epitelio. El grado de dispersión influye de forma considerable la penetración del fármacos poco solubles en los vehículos porque afecta al coeficiente de difusión, por tanto al aumentar el grado de dispersión en el vehiculo, aumenta el coeficiente de difusión y en consecuencia la penetración.

- Solubilidad del fármaco: La solubilidad del fármaco afectara a la liberación, ya que al aumentar la concentración de fármaco disuelto en el vehiculo, el gradiente de concentración entre el fármaco y la superficie cutánea será mayor, lo que se traduce en una mayor cantidad de fármaco liberado. La actividad termodinámica depende de la concentración y solubilidad del fármaco, así como de interacciones fármaco -fármaco y fármaco -vehiculo. La actividad termodinámica del fármaco en el vehiculo será máxima cuando se utilicen soluciones saturadas. Este parámetro indica la tendencia del fármaco a escapar del vehiculo (Carelli y cols.1992). Otros autores recomiendan utilizar soluciones supersaturadas (Valenta y cols.2000) o suspensiones (Lippold, 1992) con el fin de que no disminuya la concertación de fármaco disuelto durante el proceso de liberación del mismo. En este caso se tendrá que tener en cuenta la velocidad de disolución del fármaco. Por otro lado debe existir un equilibrio entre la afinidad del fármaco-vehiculo y la afinidad fármaco-piel/mucosa, ya que una afinidad extrema hacia uno de ellos significara que el fármaco permanecerá mayoritariamente en el sitio mas afín. Por tanto los fármacos lipófilos disueltos en medios acuosos se absorberán antes que si se encuentran en un solvente lipófilo a la misma concentración (Jacobi y cols.2006). La mayoría de fármacos son acido o bases débiles por lo que a pH fisiológico se encuentran parcialmente ionizados, presentando una solubilidad pH dependiente. Los fármacos que se encuentran ionizados difunden con mayor dificultad que los que se encuentran en su forma molecular.

1. INTRODUCCIÓN

Teniendo en cuenta todos estos factores, se podría afirmar que las características ideales del fármaco que le permiten penetrar a través de la piel son una solubilidad acuosa de 1mg/mL, peso molecular menor a 500 Dalton, punto de fusión menor a 200°C. Como regla general se estima que el fármaco no tenga capacidad para formar más de dos puentes de hidrógeno y así poder considerarlo con buena difusión (du Plessis y cols. 2002).

b. Criterios relacionados con el vehículo

- **Concentración de fármaco:** Según la ley de Fick para la difusión, la velocidad de transferencia de una sustancia desde zonas de alta concentración a las de baja concentración es proporcional al gradiente de concentración. Además a mayor fármaco solubilizado en el vehículo sin poseer una selectividad selectiva con este, presentara una mayor actividad termodinámica. Esta aumentará si se incrementa la concentración del fármaco en la formula o manipulando el vehículo para disminuir la solubilidad del fármaco en este (Thomas y Finnin, 2004).
- **Oclusión.** La oclusión (de sistemas transdérmicos, apósitos oclusivos y bases lipófilas) ha demostrado aumentar la permeabilidad de algunos fármacos (Feldmann y Maibach, 1965). Por tanto a medida que aumenta la fase acuosa en la formulación, el poder oclusivo de la misma disminuye. Los mecanismos implicados en este proceso se piensa que pueden ser debidos a la acumulación de agua dentro de la piel, hinchando los corneocitos y aumentando el agua de la matriz intercelular (Tsai y Maibach, 1999); por otro lado también aumenta la temperatura de la piel y disminuye la pérdida de co-solventes por evaporación (Taylor y cols.2002). No obstante, en algunos casos la oclusión puede provocar irritación y favorecer el crecimiento microbiano (Tanner y Marks, 2008).
- **Viscosidad:** Cuanto menor sea la viscosidad del vehículo mayor será la liberación del fármaco (Al-Khamis y cols.1986) ya que tendrá un mayor coeficiente de difusión. La elección de la formulación y su comportamiento reológico apropiado determinara el tiempo de residencia y la exposición local del fármaco en el sitio requerido.

- Dosis y frecuencia de aplicación (Lu y Gao, 2010): Con el fin de entender el efecto de los excipientes sobre la penetración transepidérmica, es recomendable la aplicación de dosis finitas en el compartimento donador (> 100 mg de formulación por cm^2). La aplicación de dosis infinitas da lugar a una relativamente constante fuerza de entrada del fármaco a través de la piel, permitiendo alcanzar estados estacionarios plasmáticos. Sin embargo en la práctica diaria no se aplican dosis tan elevadas, sino aproximadamente $2\text{-}5$ mg/cm^2 , dando lugar a una fina capa de la formulación ($10\text{-}30$ μm), que es menos de lo necesario para que se sature de fármaco el estrato córneo. Obtenemos así un modelo de dosis finitas. Por otro lado los efectos que tienen los excipientes sobre la piel pueden afectar a la penetración transdérmica de forma diferente cuando se aplican en forma de dosis única o siguiendo un esquema de múltiples dosis. Para estudiar el efecto de la frecuencia de dosis, es más aconsejable realizar un estudio de múltiples dosis finitas.

- c. Promotores de la absorción: Los promotores de absorción son moléculas de diferente naturaleza química que actúan reversiblemente a nivel del estrato córneo, desestructurando y facilitando que el fármaco permee más rápidamente hacia los tejidos viables y pase a circulación sistémica. Existe una teoría general (Lipid-Protein-Partitioning) basada en las posibles alteraciones a nivel molecular que sufre el estrato córneo por acción de los promotores. Esta teoría postula (Barry, 1988; Barry, 1987; Potts y cols.1991) que la acción promotora sobre las diferentes estructuras histológicas epidérmicas se va a producir mediante una o más de las siguientes acciones:
 - i. Interacción con las proteínas celulares, promoviendo la permeación a través de los corneocitos (vía intracelular).

 - ii. Interacción con la estructura lipídica que rodea los corneocitos, incrementando la difusión intercelular (vía intercelular). Esta acción puede producirse por la interacción de los promotores con los grupos polares de los lípidos, por la inserción de estos entre las estructuras lipídicas o por

cambios en la polaridad en determinadas zonas, variando el coeficiente de reparto del fármaco entre el vehículo y la piel.

- Ácidos y alcoholes grasos (Figura 23 y 24): El efecto promotor de este grupo de sustancias depende en gran medida de sus estructuras. Parece ser que el efecto promotor de estos se debe a la fluidificación de los lípidos cutáneos y al incremento en el nivel de hidratación superficial que estas sustancias pueden desarrollar (Cevc y cols.1996). Los ácidos grasos saturados generalmente aumentan el coeficiente de reparto del fármaco entre el vehículo y la piel. Su efectividad está relacionada con la longitud de la cadena hidrocarbonada. Las cadenas con 10 (Tanojo y cols.1997) o 12 (Kim y cols.1993) átomos de carbono son las que presentan una lipofilia óptima. Los ácidos grasos insaturados alteran la estructura de los lípidos extracelulares y disminuyen la resistencia a la difusión de los compuestos, aumentando su absorción. En general los ácidos grasos insaturados son más eficaces que sus análogos saturados, ya que debido a la flexión del doble enlace se produce un mayor desorden en la bicapa lipídica (Aungst, 1995). Respecto al grado de insaturación óptimo los estudios no son concluyentes. Mientras que algunos autores señalan que el efecto promotor aumenta al aumentar el número de insaturaciones (Carelli y cols.1992), otros apuntan a que poseen efectos similares (Kandimalla y cols.1999) o incluso menores (Santoyo, 1996), equiparándolos a los saturados. Se ha sugerido que el ácido oleico se dispone de forma heterogénea en las bicapas lipídicas dando lugar a la formación de canales fluidos dentro del estrato córneo (Walker y Hadgraft, 1991). El ácido oleico actúa en la ruta no polar, incrementando tanto la difusión como el reparto del fármaco (Koyama y cols.1994; Yamashita y cols.1995), pero en la ruta polar aumenta solo el reparto, lo que parece indicar que aumenta la hidratación del estrato córneo. Por otro lado cabe destacar que los ácidos grasos pueden formar pares iónicos con fármacos catiónicos aumentando así su coeficiente de reparto y por tanto su absorción (Aungst y cols.1990). También cabe destacar que el ácido oleico tiene que ser utilizado con cuidado debido a que su aplicación causa cambios morfológicos en las células de Langerhans de la epidermis. Estas células juegan un papel importante en la iniciación y coordinación de la respuesta inmune mediada por linfocitos T. Por tanto puede causar inmunosupresión en la piel a altas concentraciones (Kogan y

Garti, 2006). El efecto promotor de los ácidos grasos parece ser concentración dependiente, al aumentar la concentración del ácido graso aumenta el efecto promotor hasta llegar a un máximo a partir del cual su efecto disminuye (Singh y cols.1966). Los alcoholes grasos poseen el mismo mecanismo promotor que sus correspondientes ácidos grasos, pero más débil, ya que las interacciones con el estrato córneo son menores (Komata y cols.1992). De estos el más efectivo es el alcohol láurico que puede ser tan efectivo como el ácido láurico (Yamada y Uda, 1987)

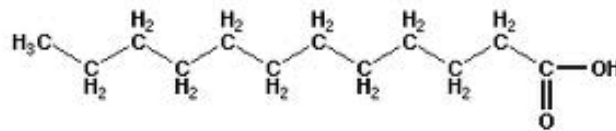


Figura 23. Estructura ácido láurico.

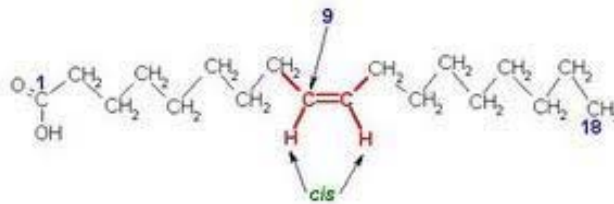


Figura 24. Estructura ácido oleico

- Esteres de alcoholes grasos: Destaca el miristato de isopropilo (Figura 25). Actúa sobre los lípidos extracelulares, fluidificándolos (Leopold y Lippold, 1995a) y disminuyendo la resistencia de los mismo al paso del fármaco (Leopold y Lippold, 1995b) y/o aumentando el coeficiente de reparto entre el fármaco, la formulación y el estrato córneo (Sato y cols.1988).

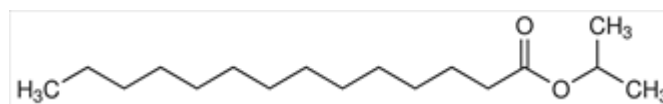


Figura 25. Estructura miristato isopropilo.

- Azona (Figura 26): (1- dodecilazacicloheptan-2-ona). Actúa rompiendo la organización de lípidos y aumentando el contenido hídrico de las proteínas del estrato córneo (Goodman y Barry, 1986). La inserción del gran ciclo de la

1. INTRODUCCIÓN

azona en las regiones lamelares impide el empaquetamiento y la cristalización de los lípidos de la estructura, disminuyendo la resistencia a la difusión. Además su cadena de doce átomos de carbono, coincide con las dimensiones del colesterol, pudiendo alterar las interacciones colesterol-ceramida o colesterol-colesterol (Allan, 1995). La acción promotora de la azona depende de la concentración empleada y de la lipofilia del fármaco (Diez-Sales y cols.1996). Se usa normalmente a concentraciones bajas (1-5%) y su actividad se ve favorecida por el uso de cosolventes como el propilenglicol. En estos casos el papel del cosolvente es modificar el reparto del promotor en la piel (Beastall y cols.1988). Además existe una potenciación del efecto promotor cuando se combinan ambos ya que la azona aumenta el paso de los fármacos por vía intercelular y el propilenglicol lo hace por vía intracelular (Takeuchi y cols.1995).

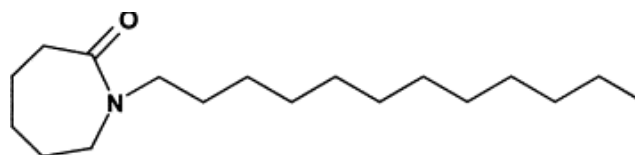


Figura 26. Estructura azona

- tensioactivos: Por encima de la concentración micelar crítica los tensioactivos forman micelas, lo que hace disminuir la actividad termodinámica. El efecto promotor observado se debe a la capacidad de estos compuestos al penetrar la piel y desorganizar su estructura. Los tensioactivos parecen alterar tanto estructuras lipídicas como las proteínas del estrato corneo (Goodman y Barry, 1989). Los tensioactivos catiónicos son los que producen una mayor irritación y daño en la piel, seguido de los tensioactivo aniónico y por ultimo los no iónicos. Estos últimos además tienen un efecto promotor mas inmediato ya que penetran en la membrana mas fácilmente que los que se encuentra cargados en su superficie (Ashton y cols.1992). El efecto promotor de los tensioactivos depende en gran medida de de su afinidad por el estrato corneo y de la solubilidad del fármaco en el vehículo.
- Terpenos (Figura 27): son constituyentes de los aceites esenciales constituidos por unidades de isopreno (C₅H₈), pudiendo incluir diversos heteroátomos en su

estructura. Se clasifican en función del número de isoprenos que tienen en su estructura en monoterpenos (C10), sesquiterpenos (C15) y biterpenos (C20). Las características fisicoquímicas varían de unos a otros, pero por lo general suelen tener una elevada lipofilia. Algunos autores (Williams y Barry, 1991b) han encontrado una relación lineal entre el efecto promotor del terpeno y el logaritmo del coeficiente de reparto octanol-agua, por el contrario otros (Takanashi y cols.1999) encontraron una relación parabólica. Los terpenos actúan en parte rompiendo el empaquetamiento lipídico intercelular, aumentando así la difusión del fármaco (Barry, 1991). El mentol se distribuye entre los espacios intercelulares del estrato corneo con la consiguiente desorganización reversible de los lípidos (Kunta y cols.1997), el timol aumenta la fluidez lipídica del estrato corneo y perturba la integridad de la epidermis. La carvona y el cineol perturban solo la integridad de la epidermis (Gao y Singh, 1997). En caso de los fármacos lipófilos, el uso de estos promotores también hace aumentar el reparto del fármaco, debido al efecto solubilizante del mismo (Williams y Barry, 1991a). En caso del eugenol y el limoneno además se puede observar extracción lipídica del estrato corneo, lo que contribuye a su efecto promotor (Zhao y Singh, 1998).

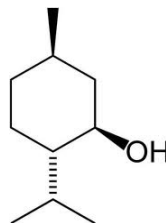


Figura 27. Estructura del mentol

- Sulfóxidos: dimetil sulfóxido (DMSO, Figura 28) es un solvente polar que penetra rápidamente ejerciendo su efecto promotor, que es dependiente de la concentración (Kai y cols.1993). El efecto promotor del DMSO se debe por un lado a las propiedades de solubilización de fármacos, lo que hace aumentar el reparto del fármaco en la piel. Por otro lado también tiene efecto sobre el estrato corneo lo que disminuye la resistencia a la difusión (Barry, 1991). EL DMSO a concentraciones bajas se reparte inicialmente dentro de los corneocitos, desplaza el agua unida a las proteínas y crea una capa de solvatación mayor, cuando la concentración aumenta (por encima del 60%) produce un desplazamiento del

1. INTRODUCCIÓN

agua que rodea a las cabezas polares de los lípidos intercelulares, lo cual favorece sobre todo la difusión de compuesto polares. Por ultimo también parece distorsionar el empaquetamiento de las cadenas hidrocarbonadas (Anigbogu y cols.1995). Debido a las altas concentraciones requeridas, la irritación cutánea que produce así como el mal olor de sus compuestos de degradaciondel DMSO, se ha estudiados derivados del mismo como el tetradecilmetilsulfoxido (TDCMS) y el decilmetilsulfoxido (DCMS).

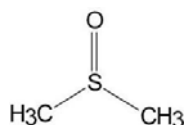


Figura 28. Estructura DMSO

- Urea (Figura 29): Es un compuesto higroscópico que aumenta la hidratación del estrato corneo, ya que induce la queratolisis de la piel después de un contacto prolongado, lo que forma canales hidrofilitos a través de los cuales pueden difundir los fármacos (Kim y cols.1993). También parece rebajar la temperatura de transición de los componentes lipídicos aumentando al fluidez a temperatura ambiente (Beastall y cols.1988). Su uso como promotor esta limitado debido a sus efectos protelíticos.

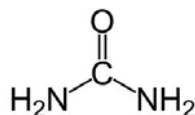


Figura 29. Estructura urea

- Pirrolidonas (Figura 30): La capacidad solubilizante de las pirrolidonas se debe en parte a la formación de pares iónicos lipófilos con fármacos aniónicos. La 2-pirrolidona es un solvente higroscópico similar al DMSO. A bajas concentraciones se reparte en las proteínas, desnaturalizando la alfa queratina y a altas concentraciones interacciona con los lípidos aumentando su fluidez. Además aumenta el contenido de agua dentro del estrato corneo. La 2-pirrolidona parece aumentar la penetración y difusión de fármacos a través de la ruta polar y disminuye los de la ruta no polar (Southwell y Barry, 1984). Con el fin de mejorar el efecto promotor se han desarrollado derivados de la

pirrolidonas como la N-metil-2-pirrolidona entre otros. Esta actúa por extracción parcial de esfingolípidos del estrato corneo (Ogiso y cols.1995) y por hidratación de la piel debido a su capacidad humectante (Bhatia y Singh, 1997). La N-dodecil-2-pirrolidona en cambio se intercala en la matriz de ceramidas por repulsiones electrostáticas (Fuhrman Jr y cols.1997).

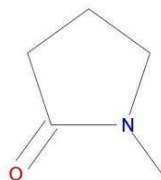


Figura 30. Estructura de n-metil -2 -pirrolidona

- Alkoholes: El etanol ha sido muy utilizado como co-solvente en formulaciones tópicas, ya que tiene la capacidad de aumentar la solubilidad de algunos fármacos. Parece ser que con los compuestos hidrófobos, que penetran disolviéndose en la regiones lipídicas fluidas del estrato corneo, el etanol se disuelve en estas regiones, aumentando así la solubilidad del fármaco en ellas (Berner y cols.1989). En caso de fármacos hidrófilos, el etanol produce una extracción de sustancias lipídicas y peptídicas, consiguiendo aumentar la porosidad del estrato corneo. Al igual que en otros casos el efecto promotor del etanol depende de la concentración en la que se introduce en la formulación. Así pues a concentraciones bajas el etanol aumenta la solubilidad del fármaco en el estrato corneo (Yum y cols.1994), a concentraciones altas el etanol altera la estructura del estrato corneo aumentando la difusión de sustancias (Jiang y cols.1998). El mecanismo de acción no es totalmente claro, parece que puede producir una deshidratación del estrato corneo (Megrab y cols.1995) y un encogimiento de la queratina, con lo consiguientes cambios conformacionales (Berner y cols.1989). Al aumentar el número de átomos de carbono de la cadena del alcohol, aumenta el efecto promotor (unas cuatro veces por cada grupo metilo introducido), siendo el n-propanol más potente que el isopropanol (Kim y cols.1992).
- Propilenglicol es generalmente un buen solubilizante de fármacos lipófilos en vehículo acuoso. Este es uno de los mecanismos promotores de este compuesto.

1. INTRODUCCIÓN

Por otro lado al igual que el etanol se disuelve en las capas acuosas que se encuentra entre las bicapas lipídicas y alteran su composición. Por tanto aumentan la afinidad de esta fase por las sustancias lipófilas y favorecen el reparto de estos compuestos entre el vehiculo y la piel. Sin embargo grandes cantidades de propilenglicol en las formulaciones puede reducir el coeficiente de reparto entre el vehiculo y la piel pudiendo contrarrestar el beneficio de aumentar el gradiente de concentración por la reducción global de la actividad del fármaco en el vehiculo y por tanto disminuir el flujo transdérmico (Turi y cols.1979). También se ha observado que se intercala en las cabezas polares de los lípidos (Bouwstra y cols.1991) y que produce una solvatación de la alfa queratina de los corneocitos por lo también favorece la penetración de fármacos por vía intracelular (Takeuchi y cols.1993).

- Nanoemulsiones y microemulsiones: Las nanoemulsiones mejoran el perfil transdérmicos, aumentando el flujo de entrada, en parte debido a su elevada capacidad de solubilización de fármacos, aumentando su actividad termodinámica (Devarajan y Ravichandran, 2011). Kreilgaard (2002), aportan un estudio en el que comparan distintas microemulsiones con vehículos tradicionales (geles), observando un mayor flujo transdérmico en el caso de las microemulsiones. Pero cuando se comparan microemulsiones saturadas de fármaco (lidocaína) solo se observa una pequeña variación en los valores de flujo, de esta forma sugiere que la estructura de la microemulsión no da lugar por si misma a un significativo incremento en la penetración. El aumento del flujo comparado con las formulaciones tradicionales parece pues ser atribuido a la mayor solubilidad de la lidocaína en el vehiculo, incrementando el gradiente de concentración a través de la piel. La microemulsiones con un mayor contenido en surfactantes incrementan la penetración del fármaco, indicando que esa potenciación es principalmente debida a la modulación del surfactante sobre la barrera cutánea (Kreilgaard, 2002). Por otro lado también observó que el coeficiente de permeabilidad del fármaco en la microemulsión no era sustancialmente mayor comparado con otras formulaciones tradicionales como las emulsiones con los mismos constituyentes. El flujo transdérmico global es incrementado debido a los elevados gradientes de concentración por la habilidad de la microemulsión en la solubilización de fármacos hidrófilos y lipófilos. En el

caso de las microemulsiones, al contrario que con las nanoemulsiones, son sistemas dinámicos, que fluctúan continua y espontáneamente. Esto hace plausible que monómeros del tensioactivo puedan difundir a la superficie de la piel y actuar como promotor de la permeación, bien por causar una disrupción de la estructura lipídica del estrato corneo, facilitando la difusión a través de ella (provocaría un aumento del paso tanto dérmico como transdérmico) o bien por aumentar la solubilidad del fármaco en la piel, incrementando por ejemplo el coeficiente de partición del fármaco entre la piel y el vehiculo (en este caso se aumentara principalmente el paso dérmico) (Kreilgaard, 2002).

La incorporación de colesterol en las nanoemulsiones aumenta la permeación de fármacos hidrófilos ya que incrementa los dominios hidrófilos del estrato corneo. En cambio la incorporación de ácido oleico facilita la difusión de fármacos a través de los dominios lipídicos del estrato corneo (Schmalfuss y cols.1997).

5.2. Ecuaciones que definen las cinéticas de penetración transdérmica

Como se ha comentado anteriormente el paso de fármacos a través de la piel se produce por vía transepidérmica, siendo minoritaria la penetración a través de glándulas sudoríparas o por folículos pilosos. En general el paso de fármacos a través del estrato corneo esta regido por un proceso de difusión pasiva, regido por la 2ª ley fick (Scheuplein y Blank 1971). La cantidad de fármaco (Q) que aparece en el medio receptor a un tiempo (t) se calcula mediante la siguiente expresión (ecuación 2):

$$Q = APLC_0 \left[\frac{Dt}{L^2} - \frac{1}{6} - \frac{2}{\pi^2} \sum_{n=1}^{\infty} \frac{(-1)^n}{n^2} \exp\left(-\frac{Dn^2\pi^2 t}{L^2}\right) \right] \quad \text{Ecuación 2}$$

Donde A es el área de difusión, P el coeficiente de reparto entre el vehiculo y la piel, L el espesor de la membrana, Co la concentración inicial del principio activo en el vehiculo y D el coeficiente de difusión del fármaco en la piel.

Cuando el coeficiente de difusión y la concentración de fármaco permanecen constantes (modelo de dosis infinitas) a lo largo del tiempo nos encontramos en estado estacionario, donde la anterior ecuación se expresa como (ecuación 3)

1. INTRODUCCIÓN

$$\frac{Q}{A} = PLC_0 \left(\frac{D_t}{L^2} - \frac{1}{6} \right) \quad \text{Ecuación 3}$$

A partir de esta el flujo, J , se determina desde la pendiente de la recta que representa la cantidad de fármaco que, por unidad de superficie, atraviesa una membrana frente al tiempo, una vez alcanzado el estado estacionario. El flujo se relaciona con el coeficiente de permeabilidad, K_p , mediante la concentración inicial de fármaco (ecuación 4) (Barry, 2002).

$$J = \frac{C_0 PD}{L} = C_0 K_p \quad \text{Ecuación 4}$$

Mediante la extrapolación de la parte lineal de la curva de estado estacionario al eje de abscisas (tiempo) se puede determinar el tiempo de latencia T_{lag} (ecuación 5)

$$T_{lag} = \frac{L^2}{6D} \quad \text{Ecuación 5}$$

Cuando obtenemos un modelo de dosis finitas el flujo no es constante en el tiempo. Se obtiene un flujo máximo dado por la ecuación siguiente (ecuación 6)

$$J_{max} = \frac{1.85 D P C_0 \delta}{L^2} \quad \text{Ecuación 6}$$

Donde δ es el espesor de la formulación depositado sobre la superficie de la piel.

Por otro lado Higuchi en 1960, relaciona el flujo con la actividad termodinámica del fármaco en el vehículo, α , mediante la expresión (ecuación 7):

$$J = \frac{D\alpha}{L\gamma_s} \quad \text{Ecuación 7}$$

Donde γ_s es el coeficiente de actividad del fármaco en el estrato corneo y permanece constante si el vehículo no interacciona con la piel.

De forma análoga para explicar el paso de fármacos a través de la mucosa se han propuesto las siguientes ecuaciones (Sudhakar y cols. 2006):

El flujo transmucosa para fármacos que pasan a través de la ruta paracelular es el siguiente (ecuación 8)

$$J = \frac{DC\varepsilon}{h} \quad \text{Ecuación 8}$$

Siendo D el coeficiente de difusión en los espacios intercelulares, h la longitud de la ruta paracelular, ε la fracción de área de la ruta paracelular y C la concentración de fármaco en el compartimento donador.

Por otro lado las ecuaciones que predicen el paso de fármaco a través de la ruta transcelular es (ecuación 9):

$$J = \frac{DC(1-\varepsilon)}{h} \quad \text{Ecuación 9}$$

Donde D es el coeficiente de difusión del fármaco en los espacios transcelulares y h la longitud de la ruta transcelular.

Por último con la obtención del parámetro flujo, se puede predecir cuales serían las concentraciones plasmáticas en estado estacionario tras la aplicación de un dispositivo de administración transdérmico o transmucosa

$$C_{ss} = \frac{J \cdot SAT}{Cl_p} \quad \text{Ecuación 10}$$

Donde C_{ss} es la concentración plasmática en estado estacionario; SAT es el área de aplicación del dispositivo y Cl_p es el aclaramiento plasmático del fármaco.

1. INTRODUCCIÓN

La técnica mas utilizada para evaluar *in vitro* la permeación transdérmica de un fármaco a través de la piel es el método de las células de difusión. Las células de difusión estática mas utilizadas hoy en día son las células de difusión vertical de Franz. Estas constan de un compartimento donador (donde se deposita la forma farmacéutica a ensayar) y un compartimento receptor (que simularía el tejido subyacente vascularizado, el fármaco en este compartimento seria el susceptible de distribuirse sistémicamente), separados por una membrana. La membrana mas adecuada para la realización de estos estudios es la piel humana, aunque en ausencia de esta se puede utiliza piel de cerdo, que presenta propiedades histológicas, bioquímicas y un perfil de permeabilidad similar a la humana.

Dos son los puntos críticos para la evaluación de la permeación transdérmica y transmucosa mediante estas técnicas. Por un lado el mantenimiento de las propiedades de barrera de la piel y mucosa. En caso de la piel, como ya se ha comentado anteriormente, es el estrato corneo y en el caso de la mucosa el mantenimiento de la viabilidad epitelial, así como los lípidos intercelulares. El mantenimiento de esta integridad del tejido puede evaluarse *in Vitro* mediante la medición de la perdida de agua transepitelial (TEWL). El otro punto critico es el mantenimiento de las condiciones sink a lo largo del experimento (el volumen del medio receptor debe ser por lo menos 3 veces mayor al necesario para formar una solución saturada de fármaco). De esta manera se asegura que la permeación del fármaco no se ve limitada por la solubilidad del mismo en el medio receptor.

5.2.1. Cuantificación del fármaco en la piel

Determinar la cantidad de fármaco retenido en la piel nos dará una idea acerca de la eficacia de un tratamiento local. Existen diversos métodos que nos permite determinarlo

- a. Extracción por disolvente (Touitou y Abed, 1985): consisten en la maceración de la piel en un determinado disolvente, que es analizado posteriormente. Este es un método rápido y sencillo que se puede utilizar prácticamente con cualquier principio activo. El inconveniente que representa esta técnica es que no da información acerca del fármaco retenido en cada capa de la piel, sino que da una información de la piel completa.

- b. Cuantificación mediante cortes horizontales. Consiste en cortar la piel en láminas paralelas de espesor variable mediante un criomicrotomo. El fármaco retenido en cada lámina es extraído con un disolvente y se cuantifica mediante una técnica analítica (Jadoul y cols.1995).
- c. Tape stripping. Consisten en aplicar tiras adhesivas en el estrato corneo. Se determina la cantidad de fármaco extraído con cada tira (Kammerau y cols.1975).
- d. Autorradiografía. Se realiza con el fármaco marcado radiactivamente. Mediante sistemas informáticos se puede cuantificar el fármaco en cada estrato de la piel, así como en los folículos pilosos, glándulas sebáceas y sudoríparas (Touitou y cols.1994).
- e. Espectroscopia. Como la espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier con reflectancia total atenuada (Mak, 1990). Estas técnicas son rápidas pero requieren de instrumentación muy costosa.

NANOEMULSIONES DE NISTATINA PARA
APLICACIÓN EN CANDIDIASIS MUCO-
CUTANEAS

CAPÍTULO 2. OBJETIVOS Y PLAN DE
TRABAJO

Las infecciones fúngicas superficiales se encuentran entre las enfermedades más extendidas mundialmente. Entre ellas las candidiasis muco-cutáneas, en piel y mucosa oral son unas de las manifestaciones clínicas más comunes tanto en pacientes inmunocompetentes como inmunodeprimidos.

Adicionalmente, entre el 60 y el 90% de los casos afectados de mucositis (pacientes bajo tratamientos quimio o radioterápicos) están infectados por *Cándida*. Un tratamiento efectivo reducirá el tiempo de duración de la infección así como la gravedad de la enfermedad, derivada por una candidemia debido a la presencia de heridas, quemaduras, intubación, catéteres vasculares, nutrición parenteral total, diálisis, tratamiento con corticoides, antibióticos de amplio espectro o ventilación mecánica.

Como tratamiento, la nistatina es uno de los antifúngicos más efectivo tanto en micosis cutáneas como bucales. Se trata de un fármaco con propiedades fungicidas y fungistáticas, activo contra una gran variedad de hongos.

Una de las ventajas de la nistatina es que presenta un prolongado efecto post-antifúngico (PAFE), lo que permite una administración distanciada con una menor incidencia de efectos adversos. La nistatina parece tener además, un efecto profiláctico ya que es capaz de suprimir la adhesión celular al epitelio mucoso y a las dentaduras previniendo así la propagación sistémica de la candidiasis oral en pacientes comprometidos.

Pese a ser conscientes de la incidencia y gravedad de la enfermedad así como de las ventajas que representa la nistatina en el tratamiento de las candidiasis, son escasas las formulaciones comercializadas hasta el momento y en el caso de estar disponibles estas no son del todo adecuadas, bien por su alto contenido en alcohol o sacarosa, en el caso muco-oral, bien por la inclusión de otros activos como corticoides y antibióticos, en el tratamiento cutáneo, no indicados para el tratamiento de infecciones cuya etiología sea únicamente de tipo fúngico.

Hoy en día el número de trabajos que incorporan nistatina en otras formas farmacéuticas ha ido en aumento. Diferentes autores han centrado sus investigaciones en este campo mediante el uso de conjugados, liposomas, ciclodextrinas, micelas o sistemas mucoadhesivos.

2. OBJETIVOS

El gran interés suscitado reside en la estructura físico-química, insolubilidad acuosa y toxicidad sistémica del polieno, en cuestión, lo que representa un reto para su formulación. En este sentido las nanoemulsiones constituyen un sistema de vehiculización de fármacos con grandes perspectivas de futuro, debido a sus numerosas propiedades y aplicaciones. No es de extrañar que estén sometidas a una intensa investigación en la actualidad para tratar de determinar todas sus posibilidades.

Por tanto, el objetivo de la presente Tesis Doctoral ha sido, el desarrollo, caracterización y evaluación *in vitro- ex vivo* de dos nanoemulsiones como vehículos de nistatina para el tratamiento de la candidiasis cutánea y la candidiasis bucal asociada a mucositis, respectivamente.

Bajo estas premisas, a continuación se exponen los principales aspectos metodológicos del plan de trabajo realizado:

- a) Desarrollo y validación de un método sensible y rápido como técnica analítica de referencia para el análisis de la Nistatina. Según los ensayos que han de realizarse, en formas farmacéuticas nanoemulsionadas, se evalúa la linealidad, precisión y exactitud del método analítico.
- b) Selección de la composición cualitativa de las nanoemulsiones en base a los estudios de solubilidad del principio activo en la fase oleosa, así como de su idoneidad para su aplicación sobre piel o mucosa oral.
- c) Selección de la relación de los componentes de las nanoemulsiones mediante la construcción de diferentes diagramas ternarios.
- d) Síntesis y normalización de la técnica de elaboración de las distintas nanoemulsiones.
- e) Caracterización físico-química y estudios de estabilidad a largo plazo de las fórmulas.
- f) Caracterización de la forma y tamaño de los sistemas resultantes mediante Microscopía de Transmisión Electrónica y Dynamic Light Scattering.
- g) Determinación de la capacidad de incorporación y estabilidad del fármaco objeto de estudio.

- h) Evaluación de la cinética de liberación del antifúngico desde las formulaciones. Se ensaya el efecto de los factores que presumiblemente afectarán a la liberación *in vivo*: características del medio de liberación, tipo de vehiculización de fármaco, y cantidad de fármaco incorporada.
- i) Sin duda para afrontar el diseño de estos y otros nuevos excipientes tópicos, los estudios de permeación *ex vivo* así como los ensayos de retención, sobre piel humana y mucosa oral porcina, constituirán una herramienta fundamental para su desarrollo. Estos nos permitirán conocer el grado de penetración cutánea o bucal de la nistatina tras su aplicación.
- j) Estudio *in vitro* de la eficacia antifúngica de las formas de dosificación elaboradas. Valoración de su capacidad sobre *Candida albicans* y *Sacharomyces cerevisiae*.
- k) Evaluación microscópica de la ultraestructura de la mucosa oral porcina, mediante microscopía de transmisión electrónica, con la que comprobar la tolerancia de la formulación en caso de candidiasis asociada a mucositis y por tanto la inocuidad del vehículo transportador.

NANOEMULSIONES DE NISTATINA PARA APLICACIÓN EN CANDIDIASIS MUCO- CUTANEAS

CAPÍTULO 3. EVALUATION OF NOVEL NYSTATIN NANOEMULSION FOR SKIN CANDIDOSIS INFECTIONS.

(Evaluación de una nueva
nanoemulsión de nistatina para candidiasis cutánea)

Fernández-Campos F; Clares Naveros B; López Serrano O; Alonso Merino C;
Calpena Campmany AC

Mycoses
DOI: 10.1111/j.1439-0507.2012.02202.x

ARTÍCULO 1

RESUMEN

Una de las infecciones fúngicas cutáneas más comunes es la candidiasis. La aplicación tópica de fármacos en el lugar de la infección ofrece la ventaja de liberar el fármaco justo en la biofase, es decir, en el sitio donde su acción es requerida.

El objetivo de este trabajo fue evaluar una nanoemulsión de nistatina optimizada, para aplicación tópica, evitando su absorción sistémica y por tanto posibles efectos adversos indeseables.

La morfología de la gota así como la distribución de tamaños de la nanoemulsión de nistatina, fue determinada por TEM (Microscopía Electrónica de Transmisión) y DLS (Dispersión Dinámica de la Luz). Celdas de difusión vertical de Franz y HPLC, fueron usados para ensayar la liberación *in vitro* y la permeación en piel humana *ex vivo*. Los parámetros de permeación transdérmica fueron estimados usando diferentes aproximaciones teóricas. Además se realizaron estudios microbiológicos *in vitro*, con los que evaluar el efecto antifúngico de la Nistatina.

La nanoemulsión mostró una forma de gota esférica, con una superficie lisa y regular, y un tamaño entre los 70 y los 80 nm. Los datos de liberación en la nanoemulsión muestran que esta es más rápida que el Mycostatin® ungüento (formulación tomada como referencia), mejorando el índice terapéutico. Los estudios de permeación demostraron que la nistatina no alcanza la circulación sistémica y las cantidades retenidas en la piel son suficientes para asegurar un efecto antifúngico apropiado. Este efecto antifúngico es mayor cuando la nistatina se encuentra vehiculizada en la nanoemulsión cuando ésta se encuentra libre.

Gracias a los resultados obtenidos se puede decir que la formulación desarrollada en este estudio podría mejorar el tratamiento tópico de la candidiasis, si se compara con la formulación clásica.

Evaluation of novel nystatin nanoemulsion for skin candidosis infections

F. Fernández-Campos,¹ B. Clares Naveros,² O. López Serrano,³ C. Alonso Merino³ and A. C. Calpena Campmany¹

¹Biopharmaceutical and Pharmacokinetics Unit, Faculty of Pharmacy, University of Barcelona, Barcelona, Spain, ²Department of Pharmacy and Pharmaceutical Technology, Faculty of Pharmacy, University of Granada, Granada, Spain and ³Department of Chemical and Surfactant Technology, Institute of Advanced Chemistry of Catalonia Institute, (IQAC – CSIC), Barcelona, Spain

Summary

One of the most common fungal skin infections is candidosis. Topical application of drugs at the pathological sites offers potential advantage of direct drug delivery to the site of action. The main aim of this work was to evaluate an optimal nystatin nanoemulsion for topical application avoiding undesirable side effects as systemic absorption and toxicity. Surface morphology and droplet size distribution of nystatin nanoemulsion was determined by transmission electronic microscopy and dynamic light scattering. Vertical diffusion Franz-type cells and high-performance liquid chromatography were used to perform the *in vitro* release and *ex vivo* human skin permeation studies. Transdermal permeation parameters were estimated from the permeation values using different theoretical approaches. Microbiological studies were performed to evaluate the antifungal effect. Nanoemulsion exhibited a spherical shape with smooth surface and mean droplet size between 70 and 80 nm. The pharmacokinetic release showed the nanoemulsion is faster than commercial ointment Mycostatin[®] improving the potential therapeutic index. Permeation studies demonstrated nystatin was not absorbed into systemic circulation and the retained amount in the skin was sufficient to ensure an antifungal effect. This antifungal effect was higher for nystatin loaded nanoemulsion than nystatin itself. A therapeutic improvement of the nystatin nanoemulsion treatment compared with the classical ones was achieved.

Key words: Nystatin, *Candida*, nanoemulsion, skin, permeation.

Introduction

Superficial fungal infections are among the most widespread diseases known to man and major reason for patient visits to dermatologists.¹ One of the most common fungal skin infections is candidosis, and *Candida albicans* as its primary aetiologic agent.² Oral and gastrointestinal mycoses are also common in

immunocompromised patients,² infection is usually located in vaginal mucosa, skin and nails in immunocompetitive populations.³ To treat those infections antifungal drugs need to be administrated.

Despite major research and development efforts in topical systems and the advantages of this route, low stratum corneum permeability means a barrier for topical drug delivery. Moreover, is important to ensure that the rate and extent of drug delivery are sufficient to achieve therapeutic local concentrations in a reasonable time frame and provide sustained pharmacological action.⁴ In fact, the efficacy of a topically applied antifungal agent is influenced not only by its pharmacological activity but also by the ability of the drug molecules to penetrate the keratinised tissue. To effectively inhibit fungal growth, topical formulations must release a proper amount of drug at the target site with

Correspondence: C. Francisco Fernandez, Biopharmaceutical and Pharmacokinetics Unit, Faculty of Pharmacy, University of Barcelona, Joan XXIII avenue s/n, 08028 Barcelona, Spain.
Tel.: +0034934024578. Fax: +003493402463.
E-mail: franfernandez@ub.edu

Submitted for publication 27 January 2012

Revised 28 March 2012

Accepted for publication 29 March 2012

optimal penetration through the stratum corneum in therapeutically effective concentrations.⁵ Recently, increasing attention has been focused on these nanoemulsions as colloidal drug carrier systems combining advantages of nanoparticles,^{6,7} microemulsions,⁸ niosomes and liposomes,⁹ and simultaneously avoiding some of their disadvantages as easily elaborated, stability, solubilisation properties and small droplet size.^{10,11}

Nystatin (nys) is a polyene antibiotic useful in the treatment of cutaneous *Candida* infections with fungicidal and fungistatic activity. However, its use is limited due to poor solubility in aqueous media and consequently low absorption and bioavailability, as reveals the molecular structure, showed in Fig. 1, and characterised by the presence of a large lactone ring containing several double bonds.^{12,13} Special care needs to be taken for the delivery of this drug as it cannot be simply introduced into an aqueous solution because it forms aggregates that lead to formulation challenges.

Nystatin aggregates formed in aqueous media are non-selective and able to disrupt the integrity of both fungal and mammalian cell membranes, inducing toxicity and host cell death.¹⁴ Therefore, it is proposed that nystatin delivery in an unaggregated form may improve its therapeutic index.

Recently, the only commercial semisolid nys formulation (Mycostatin[®] ointment; Bristol-Myers Squibb SA., Madrid, Spain) has been removed from the market, and the current topical forms include nys mixed with different antibiotics, which sometimes are unnecessary if there is no bacterial infection. From the pharmaceutical point of view, nanoemulsions possess improved transdermal and dermal delivery properties *in vitro* and *in vivo* over classical dosage forms.¹⁵

For this reason the two main objectives were proposed, firstly the characterisation of a standardised nanoemulsion containing nys with regard to its appearance and droplet size using transmission electron microscopy (TEM) and dynamic light scattering (DLS),

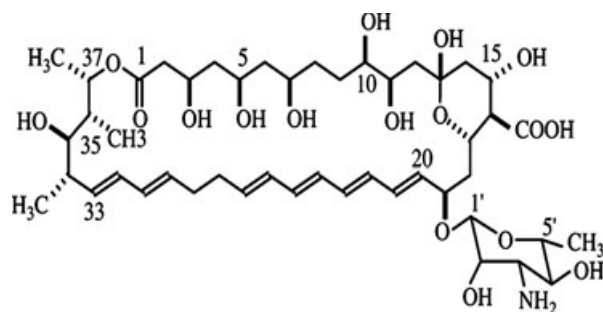


Figure 1 Chemical structure of nystatin.

as well as other physico-chemical properties. And secondly, the *in vitro* antimicrobial efficacy investigation of the nanoemulsion and the biopharmaceutical profiles of both nanoemulsion and conventional ointment (Mycostatin[®]), which include the *in vitro* drug release and the *ex vivo* human skin permeation. With all these results we would get information about its possible clinical utilisation.

Materials and methods

Materials

Nys was purchased from Fagron Iberica (Spain). Polyglyceryl-6-dioleate (Plurol oleique[®]), triglycerides medium-chain EP/NF/JPE (Labrafac lipophile[®]) and caprylocaproyl macrogol-polyoxyl-8-glyceride (Labrasol[®]) were a kind gift from Gattefossé (Saint-priest, France). Propylenglycol, HPLC-grade methanol (MeOH), N-dimethylformamide (DMF), acetonitrile (ACN) and dimethylsulphoxide (DMSO) were obtained from Panreac (Barcelona, Spain). Double distilled water was used after filtration in a Millipore system home supplied (resistivity under 18.2 M Ω \times cm). Dialysis cellulose membranes MWCO 12 kDa was purchased from Iberlabo (Madrid, Spain). Synthetic medium RPMI-1640 from Invitrogen (Madrid, Spain) and buffer 3-(N-morpholino)-propane-sulphonic acid from Sigma-Aldrich (Madrid, Spain) were also utilised.

Selection of the nanoemulsion formulation

To select the composition of the nanoemulsion formulation a pseudo-ternary diagram was constructed. Several considerations were taken into account when choosing the ingredients of the nanoemulsion. All the components are non-toxic and were selected based on the nys solubility. Labrafac lipophile[®] was chosen as oil phase, propylenglycol as hydrophylic phase and Labrasol[®] and Plurol oleique[®] at fixed mass ratio (5:1) as surfactant and co-surfactant. Mixtures of these components at different mass ratios from 2.5% to 95% of each component were prepared in glass vials. Forty-six different combinations were assayed to reach the maximum coverage ratio for the study and delineate the boundaries of phases formed. The preparation process of the nanoemulsion was conducted by mixing the components according to geometric dilution and underwent into sonication.¹⁶ The sonication was performed in ultrasonic bath p-selecta 514 (Vidrafoc, Barcelona, Spain) for 15 min and an intensity of 200 W. The selection of the nanoemulsion region was

made by visual observation of the one-phase transparent combination, droplet size and its polydispersity index. According to the nanoemulsion region in the pseudo-ternary phase diagram, the final proportion of each component were 14.87%, 17.90%, 53.47% and 13.27% respectively. Drug-containing nanoemulsion was prepared by mixing the drug, surfactants and oil, prior to the addition of propylenglycol and kept in sonication bath to form the nys loaded nanoemulsion.

Nanoemulsion physicochemical characterisation

Droplet size and morphological examination

The nanoemulsion droplet size was determined by DLS with a Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Malvern, UK). DLS is a non-invasive, well established technique for measuring the size of molecules and particles typically in the submicron region, providing in parallel the range of the particle size distribution expressed as polydispersity index (PI).¹⁷ Values are reported as the mean \pm SD of six replicates.

To corroborate the particle size and to examine the morphology, the formulation was observed using transmission electron microscopy with a Zeiss 902 CEM microscope (Zeiss, Barcelona, Spain). One drop of diluted sample was deposited on copper grids covered with a layer of formvar and allowed to stand for 4 min. After, the grids were washed twice with distilled water. The grid was later stained with one drop of 2% uranyl acetate solution and allowed to dry for 5 min before examination under the electron microscope.¹⁸ In both cases, DLS and TEM, the samples were measured directly, without previous dilution.

Evaluation of nanoemulsion

The prepared nanoemulsion was evaluated for the percentage drug content, viscosity and organoleptic characteristics; these were studied via clarity and phase separation observation. Samples were stored at room temperature.

Drug content was determined by taking 1 g of accurately weighed nanoemulsion which was diluted to 100 ml with methanol:DMF:water (55:15:30 v/v/v) and analysed by a validated high-performance liquid chromatography method, described in section 2.5.

The formulation (0.4 ml) viscosity was determined without dilution at 25 °C using a rotational rheometer HAAKE RheoStress 1 (Thermo Fisher Scientific, Madrid, Spain) with cone and plate geometry (diameter 35 mm and 2° angle) with a separation of 0.105 mm. Values are reported as the mean \pm SD of six replicates.

Prediction of long-term physical stability

A technology based on the analysis of multiple dispersion of the light was used for predicting the long-term physical stability of the developed formulations. The TurbiScanLab[®] (Formulation, L'Union, France) is an optical instrument that characterises emulsions and dispersions.¹⁹

The principle of TurbiscanLab[®] is based on the measurement of backscattering (BS) and transmission (T) signals, being able to detect the destabilisation phenomena as meaning migration or droplet aggregation, much earlier than the operator's naked eye.

Samples were stored at room temperature for 24 h and 30 days. Each undiluted formulation (32 ml) was placed on a cylindrical glass measuring cell which was completely scanned by a reading head [a pulsed near-infrared light source ($\lambda = 880$ nm) and two synchronous optical detectors receive respectively, light transmitted through the sample].

The formulation in this study was translucent, therefore only T profiles were used to evaluate the physicochemical stability of the nanoemulsion. If the T intensity profiles have a deviation under 2%, no statically significant variations on droplet size take place. Variations up to $\pm 10\%$ indicate unstable formulations.²⁰ The reading head gathered the T data each 40 μm , three times over a period of 15 min. Measurements were performed at room temperature.

Antimicrobial efficacy

Broth microdilution method was used to establish the minimum inhibitory concentration (MIC) of the nys nanoemulsion and free nys, faced with *C. albicans* ATCC 10231 and *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9763. Both microorganisms are proposed by the European Pharmacopoeia as control yeast to perform the antimicrobial drug efficacy.²¹ The procedure was based on the European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) definitive document EDef 7.1.²² This standard method provides a valid procedure for testing the susceptibility of glucose-fermenting yeast to antifungal agents by determination of the MIC. The MIC is defined as the lowest concentration of an antimicrobial agent that inhibited the growth of a microorganism. Broth microdilution is easily performed method, rapid, economical and widely used technique in clinical laboratories. A synthetic medium RPMI-1640 2% G (RPMI-1640 with glutamine, pH indicator, without bicarbonate and glucose 2% w/v) was used as working cultures. pH was adjusted to 7.0 with 1 mol l⁻¹ sodium hydroxide and final solution filtered using a 0.22 μm

filter. As samples were not sterile, chloramphenicol was added to the RPMI medium at final concentration of $500 \mu\text{g ml}^{-1}$, this antibiotic does not interfere in the yeast growth.²³ Yeasts were first cultured on Sabouraud dextrose agar at 35°C for 24 h before testing. The inoculums were prepared by suspending colonies in sterile distilled water to achieve the desired density equivalent to the 0.5 McFarland standard and counting in a Neubauer Chamber ($1-5 \times 10^6 \text{ CFU ml}^{-1}$). Working suspension was prepared by diluting the standardised suspension in sterile distilled water (1:10) to prepare $1-5 \times 10^5 \text{ CFU ml}^{-1}$. Serial dilutions from 25 to $0.0488 \mu\text{g ml}^{-1}$ of nys nanoemulsion and nanoemulsion without nys were prepared in RPMI-1640 double strength in a 96-well microdilution plates. Free nys solution in DMSO was used as reference antifungal. The final concentration of DMSO comprised less than 1% (v/v) of the total solution concentration used for the experiment. Previous studies have shown no inhibition of fungal growth in the presence of DMSO when used at similar concentrations.²⁴ Finally, $100 \mu\text{l}$ of inoculum suspension was added to each well. Well 11 was used as growth control (containing inoculum and RPMI medium) and well 12 was used as control of drug-free medium (containing only RPMI medium double strength). It was used to check that no contamination took place). The microdilution plates were read after incubation at 35°C for 24 h, with microdilution plate reader model 680 (Bio-Rad, Madrid, Spain) using an absorbance wavelength of 595 nm. Values are reported as the mean \pm SD of three replicates.

HPLC analysis

Nys was quantified in samples using a high-performance liquid chromatography (HPLC) validated according international guidelines.²⁵ All HPLC assays were performed isocratically at room temperature. The HPLC system consisted of a Waters 515 pump (Waters, Milford, MA, USA) with UV-VIS 2487 detector (Waters) set at 305 nm. A reverse-phase column (Symmetry C18, $5 \mu\text{m}$, $15 \times 0.46 \text{ cm}$), a flow rate of 0.8 ml min^{-1} was used. The mobile phase consisted of a mixture of methanol:DMF:water (55:15:30 v/v/v). The injection volume was $50 \mu\text{l}$ and total run time 15 min.

Stock solution of nys ($125 \mu\text{g ml}^{-1}$) was prepared in dimethylsulphoxide. Working standards solutions were prepared daily by suitable dilutions in Transcutol P[®] for the quantification in permeation studies, and in methanol:DMF:water (55:15:30 v/v/v) for the quantification in release studies and the drug content assay. The calibration curves were prepared and validated inter-

day ($n = 6$), each one contain six standards between 15.626 and $0.488 \text{ dimethylsulphoxide } \mu\text{g ml}^{-1}$. Linear relationship between peak areas and concentrations of the calibration curves were statistically confirmed by applying one-way ANOVA of the response factor ($P > 0.05$). Back-calculated concentrations for each point of the standards of the calibration curves shown the precision of the analytical method, expressed in percentage of variation coefficient (%CV), which were between 1.24% and 11.61%, and its accuracy expressed in percentage of relative error (%RE), which were between -4.78% and 1.55% . The lower limit of quantification was set at $0.488 \mu\text{g ml}^{-1}$ (%CV = 11.61% and RE% = -4.78%), its acceptance criteria was established at maximum precision and accuracy of 20% in both cases at the lower limit of quantification. The lower limit of detection was set at $0.09 \mu\text{g ml}^{-1}$.

Nanoemulsion release study

The release studies were performed using vertical Franz diffusion cell (FDC 400; Crown Glass, Somerville, NJ, USA) with dialysis cellulose membranes (MWCO 12 KDa) between the donor and the receptor compartment. The effective diffusional area was 2.54 cm^2 and 13 ml of receptor compartment capacity which was filled up with methanol:DMF:water (55:15:30 v/v/v). This receptor medium allows keeping sink conditions in whole experiment. In this way the released nys would be soluble at the receptor medium, in contrast to other investigation,²⁶⁻²⁹ which used water as release medium, in which nys is practically insoluble.³⁰ The system was kept at $32 \pm 0.5^\circ\text{C}$, to mimic *in vivo* skin conditions and stirred continuously. $200 \mu\text{l}$ samples were withdrawn at selected time intervals for 54.5 h and were replaced with the same volume of fresh receptor medium.

The concentration of released drug was measured as previously described (HPLC analysis). Values are reported as the mean \pm SD of the six replicates.

Five different kinetic models (zero order, first order, Higuchi, Weibull and Peppas-korsmeyer function) were used to fit the experimental data obtained from drug release experiments.

$$\%R_t/\%R_\infty = k \times t \quad \text{Zero order} \quad (1)$$

$$\%R_t/\%R_\infty = 1 - e^{-k \times t} \quad \text{First-order} \quad (2)$$

$$\%R_t/\%R_\infty = k \times t^{1/2} \quad \text{Higuchi's equation} \quad (3)$$

$$\%R_t/\%R_\infty = 1 - e^{-(t/td)^\beta} \quad \text{Weibull's equation} \quad (4)$$

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

where $\%R_t$ is the percentage drug released at time t , $\%R_\infty$ is the total percentage drug released, $\%R_t/\%R_\infty$ is the fraction of drug released at time t , K is the release rate constant, n is the diffusion release exponent that could be used to characterise the different release mechanism, $n \leq 0.43$ (Fickian diffusion), $0.43 < n < 0.85$ (anomalous transport) and ≥ 0.85 (case II transport; i.e. zero-order release)³¹; td is the time in which the 63.2% of the drug is released and β is the shape parameter.³²

A non-linear least-squares regression was performed using the WINNONLIN[®] professional edition version 3.3 software (Pharsight Corporation, Sunnyvale, CA, USA), and the model parameters calculated. Also, the Akaike Information Criterion (AIC) was determined for each model as it is an indicator of the model's suitability for a given dataset.³³ The smaller the value of AIC, the better the model adjusts the data. For the model selection also were taken into account the parameter accuracy, expressed as % coefficient of variation (%CV), and the residual distribution plots.

Ex vivo permeation experiment in human skin

Human skin from abdominal plastic surgery was used as a permeation membrane. Skin was cleaned and stored at -25°C until further use. For the experiment skin was cut using an Aesculap GA 630 dermatome (Aesculap, Tuttlingen, Germany) into 0.4 mm thick pieces at room temperature.^{34,35} The experimental protocol was approved by the Bioethics Committee of the Hospital of Barcelona, Spain, and written informed consent forms were provided by volunteers.

Permeation study was performed on vertical Franz diffusion cell (FDC 400; Crown Glass) with an effective diffusional area of 2.54 cm^2 and 13 ml of receptor chamber capacity. The skin was mounted between donor and receptor compartment of Franz diffusion cell where stratum corneum side faced the donor compartment and the dermal side faced receiver compartment, which was filled with Transcutol P[®]. This is a biocompatible medium that allows keeping sink conditions in all the experiment reference and test formulation ($n = 6$ respectively). Samples of the nanoemulsion were placed in the donor compartment at equivalent doses of 1.63 mg of nystatin.

Prior to the experiment, each skin sample was measured in triplicate using a trans-epidermal water

loss (TEWL) measurement instrument Tewlmeter TM210 (Courage & Khazaka, Koln, Germany) to check the skin integrity.³⁶ TEWL (expressed in grammes per square metre and per hour) is defined as the measurement of the quantity of water that passes from inside the body through the epidermal layer of the skin to the surrounding atmosphere via diffusion and evaporation processes.³⁷

For this purpose, the receptor compartment was filled with phosphate buffer (pH 7.4). The skin placed in cells with TEWL values higher than $10\text{ g (h m}^2)^{-1}$ were ruled out from the experiment. When the TEWL values were within the acceptable range the buffer was removed from the cell and filled with the receptor medium.

During the experiment, the temperature was kept at $32 \pm 0.5^\circ\text{C}$ by a circulating-water jacket and stirred with a magnetic rotor at a speed of 700 rpm. Samples were withdrawn at regular time intervals, up to 27 h, and replaced with the same volume of fresh Transcutol P[®] after each collection. Skin from different donors was used to test the formulations to obtain the population transdermal parameters. In this way, the variability of the biological samples is included and the parameters are more representative from the population.

Determination of the amount of drug remaining in the skin

At the end of the permeation study, the skin was removed from the Franz cell, cleaned with gauze soaked in a 0.05% solution of dodecyl sulphate and washed in distilled water. The permeation area of the skin was cut and weighed. Nys remained in the skin was extracted with acetonitrile:water (80:20, v/v) mixture during 20 min under cold sonication in an ultrasound bath, the resulting samples were measured by HPLC, yielding the amount of nys retained in the skin.³⁸ Skin permeation parameters were calculated if applicable.

Statistical analysis

All the dates were statistically analysed using SPSS[®] version 15 software (SPSS Inc., Chicago, USA) when applicable. Depending on the data distribution (normal or no-normal) a *T*-student or Mann-Whitney test was applied respectively.

Results

Physicochemical characterisation

Size and morphological characterisation

Selected nanoemulsion was transparent and monophasic. Its particle size was determined by DLS after 24,

48 h and 30 days postpreparation. Moreover, TEM characterisation was performed on the same days to observe how morphology and stability have been affected over the time.

In Table 1 the average values of droplet size and its distribution evaluated for the trial formulations, accompanied by their respective standard deviations are shown.

Results at 24 h for mean droplet size were 499.33 ± 15.10 and 479.67 ± 14.88 nm for nanoemulsion and drug loaded nanoemulsion respectively. After 48 h and 30 days postpreparation the average droplet size of both nys nanoemulsion and unloaded nanoemulsion were in the range between 70 and 80 nm with a narrow size

distribution expressed as polydispersity index which were low and similar in all cases. No statistically significant differences were found in the droplet sizes between 48 h and 30 days with unloaded nanoemulsion ($P > 0.05$) or nys nanoemulsion ($P > 0.05$).

There were no statically significant differences between the average droplet sizes regarding the incorporation of nys to the nanoemulsion in any case ($P > 0.05$).

Nanoemulsions droplets were spherical, narrow size distribution and in which the globules have a mean size smaller than 100 nm (Figs 2 and 3).

Since the first 48 h, the results of DLS and TEM indicated that the samples were stable without great

Table 1 Changes in mean droplet size (nm \pm SD) and mean polydispersity index (PI \pm SD) of nanoemulsion and nystatin loaded nanoemulsion ($n = 6$).

	Nanoemulsion		Nystatin loaded nanoemulsion		Size <i>P</i> -value
	Size	PI	Size	PI	
24 h	$499.33 \pm 15.10^{*,***}$	$0.431 \pm 0.155^{*,***}$	$479.67 \pm 14.88^{*,***}$	$0.419 \pm 0.286^{*,***}$	0.151
48 h	$72.68 \pm 03.54^*$	$0.103 \pm 0.025^*$	$77.11 \pm 03.56^*$	$0.095 \pm 0.019^*$	0.158
30 days	$75.24 \pm 02.91^{***}$	$0.066 \pm 0.023^{***}$	$79.60 \pm 05.88^{***}$	$0.103 \pm 0.043^{***}$	0.234

PI, polydispersity index; SD, standard deviation.

Significant differences between groups: *, **, *** $P < 0.05$ (*24 h vs. 48 h; **48 h vs. 30 days; ***24 h vs. 30 days).

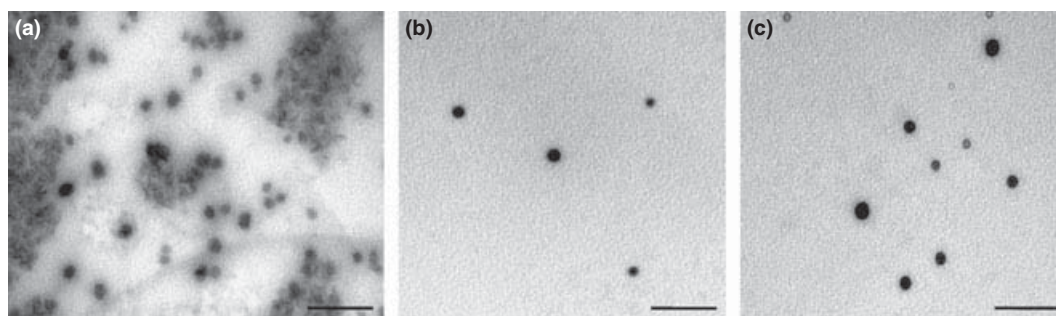


Figure 2 Transmission electronic photomicrographs of the nanoemulsion without nystatin under 50 000 \times magnification at 24 h (a), 48 h (b) and 30 days (c), bar length 500 nm.

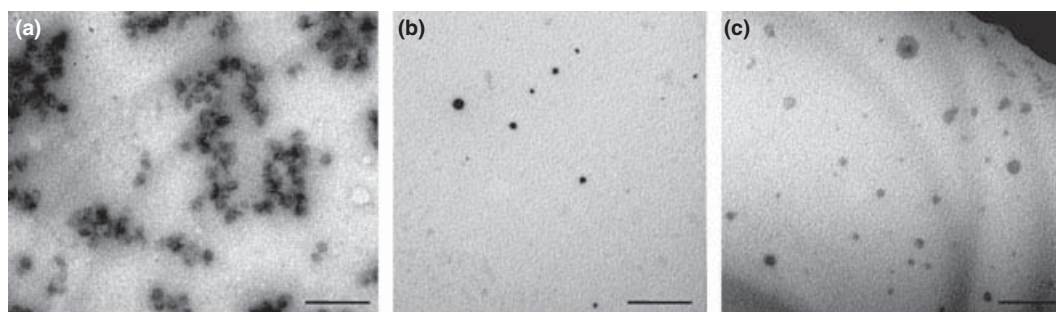


Figure 3 Transmission electronic photomicrographs of the nystatin loaded nanoemulsion under 50 000 \times magnification at 24 h (a), 48 h (b) and 30 days (c), bar length 500 nm.

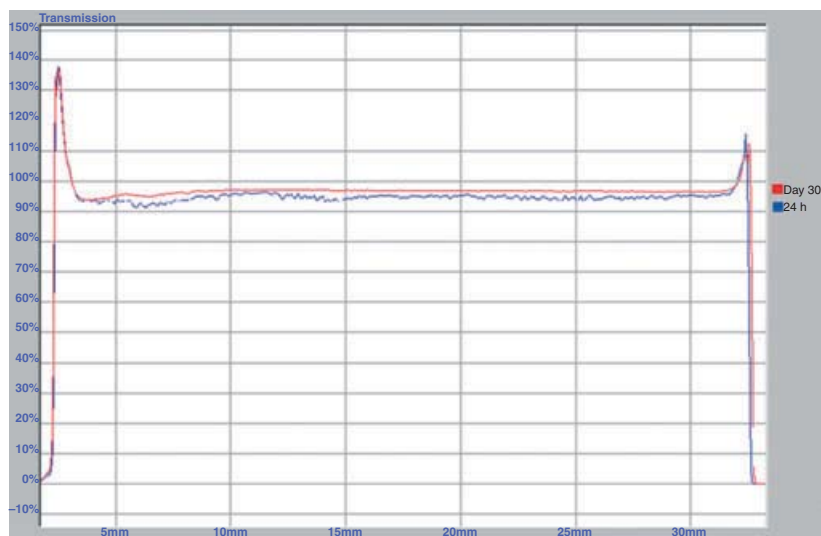


Figure 4 Superposition of transmission profiles of nystatin loaded nanoemulsion after 24 h and 30 days postproduction.

increase in particle size for at least 1 month (Figs 2c and 3c).

Prediction of long-term physical stability

There are many different methods available for the analysis of the stability of the formulations. Turbiscan-Lab[®] is an optical analyser instrument, which was used to detect destabilisation phenomena of the formulation during a period of 30 days. In comparison to classical stability measurements, this new technique allows assessing the physical stability, avoiding the dilution of the formulation. Figure 4 shows the transmission profiles of the nanoemulsion, at 24 h (blue line) and on day 30 (red line) after production. The left side of the curve corresponds to the bottom of the vial, whereas the right side corresponds to the sample behaviour on the top of the vial.

Evaluation of nanoemulsion

The nystatin loaded nanoemulsion obtained was transparent and monophasic and non-gritty. No changes in organoleptic characteristics were observed after storage. The drug content was found to be $99 \pm 0.5\%$. Results of drug content uniformity test for six replicates

Table 2 Viscosity values (mPa s \pm SD) of unloaded and loaded nanoemulsion on day 1 and 30 postproduction ($n = 6$).

	Day 1	Day 30	<i>P</i> -value
Nanoemulsion	82 ± 5	83 ± 3	0.421
Nystatin loaded nanoemulsion	88 ± 3	85 ± 2	0.384
<i>P</i> -value	0.152	0.254	–

indicated the drug was properly and uniformly dispersed.

No significant changes over time (30 days) were observed in the formulation. The incorporated drug did not affect the appearance (transparency) of the nanoemulsion formulations and did not influence significantly viscosity values of the vehicles. Viscosity values are reported in Table 2.

Antimicrobial efficacy

The broth microdilution method was used to assess the *in vitro* antifungal activity of nys loaded nanoemulsion against two yeast, *C. albicans* ATCC 10231 and *S. cerevisiae* ATCC 9763. MICs values from the *in vitro* susceptibility test after 24 h are reported in Table 3.

In any case, the nanoemulsion formulation without nys present no inhibitory effect on the yeast grown, proving that nanoemulsion is not toxic.

Table 3 MIC values ($\mu\text{g ml}^{-1}$) of free nystatin, nystatin loaded nanoemulsion and nanoemulsion after incubation at 35 °C for 24 h ($n = 3$).

	<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> ATCC 9763
Free nystatin	1.56	0.78
Nystatin loaded nanoemulsion	0.78	0.39
Nanoemulsion without nystatin	–	–

MIC, minimum inhibitory concentration.

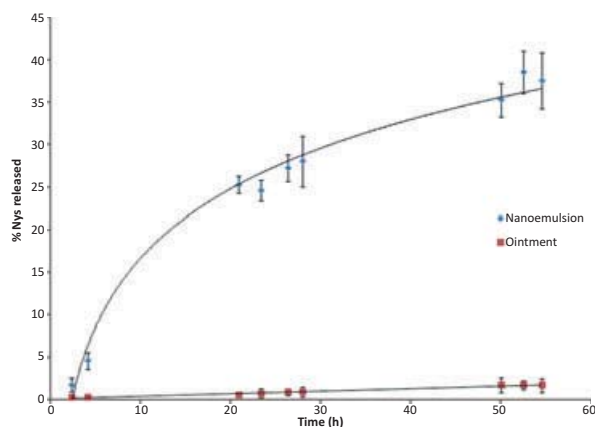


Figure 5 Observed values and fitted equation of release study for two assayed formulations nanoemulsion and ointment.

Nanoemulsion release

Prior to the release study, the saturation solubility (C_s) of nys in the mixture placed in the receptor compartment (metanol:DMF:water; 55:15:30, v/v/v) was determined to be 7.57 mg ml^{-1} at room temperature. During the release study, $C_1 < C_s \times 0.2$ was maintained, where C_1 would be the final concentration of nys in the medium, if a complete release in the acceptor media was achieved, in compliance with sink conditions.

The *in vitro* accumulated amounts of nys were measured by HPLC. Taking into account droplet size, correct molecular weight cut-off dialysis membranes were selected allowing the passage of nys (molecular weight 926 Da), but preventing the passage of the nanoemulsion drops (membrane dialysis pore diameter is equivalent to 2.4 nm).³⁹ Figure 5 shows the release patterns of the nys contained in the nanoemulsion and the ointment. To study the mechanism of nys release from both formulations, data obtained from the *in vitro* release study was fitted to various pharmacokinetic

Table 4 Permeated amounts (μg) of nystatin from nanoemulsion and ointment formulation through human skin at different incubation times (h; $n = 6$).

Nystatin permeated amounts of both formulations			
Time	Nanoemulsion Median (min–max)	Ointment Median (min–max)	<i>P</i> -value
24	1.26 (0.00–3.98)	–	–
25.5	1.30 (0.00–2.09)	1.33 (0.00–2.50)	0.260
27	1.32 (0.50–4.81)	1.43 (0.12–3.01)	0.198

equations. The kinetic models used were zero-order equation, first-order equation, Higuchi's square root of time equation, Weibull's equation and Korsmeyer-Pepas equation. The kinetic model that best describes the experimental data was selected based on the lowest AIC value. The precision of the biopharmaceutical parameters expressed as CV% and the distribution of the residuals were also taken into account. The nys release from the nanoemulsion followed a first order kinetic model, with a slow release constant (K_d) 0.034 h^{-1} (CV = 12.71%) and a total release drug (% R_∞) of 44.46% (CV = 6.16%).

Ex vivo permeation experiment in human skin

In vitro skin permeation studies were performed to compare the permeation of nys from the nanoemulsion formulation and the reference ointment. The nys doses in the donor compartment were the same.

Results showed in Table 4 are reported as median values, as the arithmetic mean, as well as the dispersion of the experimental data, expressed in terms of standard deviation, tend to be artificially increased because of the nature and degree of a skewed distribution.

For the ointment formulation, no nys amounts were found in the receptor chamber until 25.5 h, from this time until the end of the experiment (27 h), the cumulative permeated amounts of drug were very low and almost constant in six replicates. For the nanoemulsion no nys amounts were found until 24 h. Therefore, in any case flux of permeation and any other permeation parameters could be estimated. No statically significant differences were found at time 25.5 and 27 h between the two formulations ($P > 0.05$).

Determination of the amount of drug remaining in the skin

Different extraction solvents mixtures were assayed as extraction solution and ACN:water (80:20, v/v) was chosen because it was the most effective to extract higher amounts of the drug from the skin (9.5%). The quantity of nys retained after 27 h with the nanoemulsion treatment was $617.46 \mu\text{g g}^{-1}$ of tissue and for the ointment $59377.16 \mu\text{g g}^{-1}$ tissue.

Discussion

Physicochemical characterisation

Size and morphological characterisation

The incorporation of the drug into the nanoemulsion could modify the nanostructure system due to molecular interactions, especially when the drug has amphiphilic

and/or mesogenic properties.⁴⁰ For this reason the characterisation of unloaded and drug-loaded nanoemulsion were studied. However, values observed did not represent statically significant difference when comparing the nanoemulsion formulation vs. the nys loaded nanoemulsion ($P > 0.05$) (Table 1).

Contrary to expectations the mean diameter of nanoemulsion decreases significantly from 24 to 48 h (Table 1). Probably the high particle size and polydispersity index observed at 24 h could be caused by the sonication process. It has been previously described that the use of ultrasounds in fluids causes a number of physical effects: turbulence, particle agglomeration, microstreaming and biological cell rupture.⁴¹ This fact was confirmed with transmission electron microscopy images. Figures 2a and 3a show small agglomerates in the nanoemulsion. Therefore, the dramatic size reduction showed by DLS from 24 to 48 h does not correspond to a 'real' droplet size reduction, but to a droplet disaggregation. This fact was also confirmed by TEM, where the droplet remained in unaggregated stage (Figs 2b, c and 3b, c) from 48 h until 30 days; moreover, the polydispersion and droplet size are typical of nanoemulsions.⁴² As shown in Table 1, there were no statically significant differences between mean droplet size after 48 h and 30 days ($P > 0.05$).

In addition, TEM allowed the observation of the droplet structure in all formulations, and the efficiency of the preparation method used (Figs 2 and 3). The diffusion of the contrast medium used (uranyl acetate 2%) reveals the existence of a transparent area on electron bombardment (areas which the colouring has not been able to reach) and electrodense areas which denote the presence of the heavy metal.

For this reason, the oil phase or external hydrophobic phase of the nanoemulsions behaves as though transparent, whereas the polar droplets, inside to the previous ones, correspond to the electrodense areas, which appear dark to us.

Prediction of long-term physical stability

Figure 4 shows the transmittance profiles of nys nanoemulsion per 24 h and day 30 after production. The left side of the curve corresponds to the bottom of the vial, whereas the right side corresponds to the sample behaviour on the top of the vial. When the sedimentation process is produced, a transmittance decrease vs. time at the bottom of the sample is observed. When the sample suffers a creaming process, a decrease in transmittance vs. time on the top is observed. If the destabilisation phenomenon occurs due to droplet

aggregation, a transmittance decrease vs. time can be observed over the whole height of the sample.

The transmission peak at the top and the bottom of the vial corresponds to the meniscus that the sample forms in contact with the glass. The red line, corresponding to the day 30 measurement, is smoother. Due to the clarity of our samples which are translucent, a transmittance decrease or destabilisation phenomena (aggregation phenomena) in the 24 h sample (blue line) was not detected as a diminution over the whole height, but rather results in fluctuations in transmittance signal that make it a profile much more sinuous than day 30 sample. This is confirmed by the high polydispersity index obtained by DLS at 24 h (PI = 0.419), compared with the smooth red line obtained after 30 days postpreparation, when the PI was 0.103. In the same way, a higher variability in the particle size can be observed in TEM images after 24 h (Fig. 3a) compared with 48 h (Fig. 3b) and day 30 (Fig. 3c). We hypothesise that this high PI, caused by the little aggregates observed in Fig. 3a (24 h), could be due to the sonication process. The high energy supplied by the sonication could charge the droplet surface, provoking its electrostatic attraction among them.⁴¹ After a reasonable time, the system goes back to its most stable thermodynamic stage, the superficial charge disappeared, searching the ideal brownian movement. This more stable system can be observed in the smooth red line on day 30.

Evaluation of nanoemulsion

These viscosity values are in agreement to other nanoemulsions,¹⁴ as expected, because the very low viscosity is one of the characteristic of nanoemulsions.⁴² The formulation was found to be easily spreadable and non-dripping in nature.

However, patients often prefer to treat weeping infections with spray formulations. This is especially important when infections involve large areas of the body surface and hard-to-reach anatomical areas. For example, in burned patients the application of the lotions or sprays is easy and it did not produce pain or discomfort. Furthermore, it could reach the entire surface without the necessity of rubbing, avoiding the infection spreading around the body or its transmission.⁴³ Moreover, the nanoemulsion formulation could be sterilised by 0.22 μm filtration, due to its small droplet size; nys cannot be sterilised by heating methods because of its thermo-labile nature.³⁰

Indeed the newtonian behaviour of the nanoemulsion makes it suitable for its application as spray or roll-on. This novel topical treatment not only is superficial but

also exhibits a reservoir effect on deep tissues in the skin, as documented by permeation study, due to the intrinsic nanoemulsions characteristics.

Antimicrobial efficacy

Although the difference between free nys and nys loaded in the nanoemulsion is only onefold, the result was consistent within the three assays. This fact suggests that nanoemulsion enhances the antimicrobial activity of nys. This might possibly be explained by the better interaction of nys within the nanoemulsion droplets with the fungal cell membrane due to the excipient composition in the formulation. The same conclusion was proposed by Semis *et al.*,⁴⁴ who prepared a lipid-based nys formulation, which was also more potent than free nys.

Nanoemulsion release

The results obtained from the release studies suggest that nys release from nanoemulsion follows a concentration gradient pattern, based on the first Fick's law, where the released amounts are directly proportional to the amounts remaining in the dosage form. On the other hand, the nys release from the ointment follows a zero order kinetic, with a release constant (K_0) 0.0309 h^{-1} ($CV = 4.98\%$), but the total drug released at the end of the experiment was $1.66 \pm 0.32\%$. Model parameters were estimated with a good precision (under 15%) in both cases. The nys release from the nanoemulsion was faster than the ointment.

Antifungal potency and drug availability at the site of infection are key factors in the evaluation of therapeutic efficacy of an antifungal agent. Low drug concentrations could severely limit the nys therapeutic effectiveness of treatment. Low concentration of drug at the infection sites may also induce antifungal resistance in some less susceptible species. Nanoemulsion exhibit a faster and a higher amount released than the ointment (based on the release constant and it is clearly shown in Fig. 5), these circumstances could probably avoid these problems and would allow have an earlier action onset.

Ex vivo permeation experiment in human skin

As clearly shown in Table 4, and after evaluating the flux permeation and any other permeation parameters, these showed extremely low quantities of drug and probably no statically significant nystatin concentration would be found in blood, ensuring treatment with the developed nanoemulsion would have no toxic effect and

would be safe, as well as the reference formulation, as it is well known that nystatin has a very toxic effect after intravenous administration.⁴⁵

Determination of the amount of drug remaining in the skin

The higher retention of nys observed in the ointment could be due to the occlusive nature of the excipient and its high lipophilicity. Nevertheless, according to the MIC obtained from the antimicrobial susceptibility test ($0.78 \mu\text{g ml}^{-1}$), the retained amounts of nys in the nanoemulsion are more than enough to ensure its efficacy. Moreover, the less retained amounts the less probability that local adverse effect could happen.

It has been reported that nys has a post antifungal effect (PAFE) which is defined as the suppression of the yeast growth that persists following limited exposure to antifungal agents. Nys concentrations of 0.25–1 times the minimum inhibitory concentration with a 30 min drug exposure produced a significant PAFE, with an average time from 3.1 to 6.3 h in several *Candida* isolates.⁴⁶ In this way, it can be assured that the nanoemulsion treatment posses a long PAFE effect, based on the nys skin retained amounts found in the permeation assay, which was at least 700 times higher than the MIC value obtained from the microbiologic test. Previous studies have demonstrated that nys exhibits a concentration-dependent mechanism of action, from two to four times the nys MIC has a rapid fungicidal activity (is responsible of the rapid action onset) and with concentrations from 0.5 to 2 times the MIC a fungistatic activity is generally observed,⁴⁶ thus with nanoemulsion treatment both mechanism are present.

In conclusion, to accomplish the demand for efficient topical nys delivery system, attempts have been made to develop a nanoemulsion as potential carrier to achieve this objective. Nys has been effectively incorporated in a nanoemulsion, being completely solubilised by their components. The nanoemulsion had good physicochemical properties which made it suitable for its storage and topical administration. Nanoemulsion could not extensively permeate through the human skin, avoiding possible systemic adverse effect. The retained nys amounts in the skin after nanoemulsion treatment was more than enough to ensure its efficacy and PAFE effect, according to microbiology test. Based on the reported studies, we can consider nanoemulsion treatment at least as good as the classical treatment and taking into account that the ointment contains 1 million of IU of nys g^{-1} and the nanoemulsion has 31760 IU g^{-1} , we can ensure that the nanoemulsion treatment is more efficient than the ointment.

Taking into account that in several countries Mycosatin[®] ointment has been recently removed from the market, this nystatin loaded nanoemulsion represents the only alternative which contains nystatin as unique active in the composition.

Acknowledgements

We thank Gattefossé for the kindly excipient supply and formulation advices, Dr. Elisabeth Gonzalez from the Physical Chemistry, Faculty of Pharmacy, University of Barcelona, Spain, for her useful advice regarding droplet size and stability measurements and Dr. Maria Elena Mercade and Dr. Nuria Bozal from the Department of Microbiology, Faculty of Pharmacy, University of Barcelona, Spain, for their valuable contribution with the microbiological susceptibility test. We also thank Marta Bartres and Esther Torres for their help.

Conflict of interest

Authors have no conflict of interest with the content of this article.

References

- Pfaller MA, Wenzel RP. The epidemiology of fungal infections. In: Anaissie EJ, McGinnis MR, Pfaller MA (eds), *Clinical Mycology*. Philadelphia: Churchill Livingstone, 2003: 3–19.
- de Aguiar MM, de Albuquerque RP, Marinho DS *et al*. Oral sustained release nystatin tablets for the treatment of oral candidiasis: formulation development and validation of UV spectrophotometric analytical methodology for content determination. *Drug Dev Ind Pharm* 2010; **36**: 594–600.
- Kwok YK, Tay YK, Goh CL, Kamarudin A, Koh MT, Seo CS. Epidemiology and *in vitro* activity of antimycotics against candidal vaginal/skin/nail infections in Singapore. *Int J Derm* 1998; **37**: 145–9.
- Robert EM, Kalia YN. New developments in topical antifungal therapy. *Am J Drug Deliv* 2006; **4**: 231–47.
- Alberti I, Kalia YN, Naik A *et al*. Effect of ethanol and isopropyl myristate on the availability of topical terbinafine in human stratum corneum, *in vivo*. *Int J Pharm* 2001; **219**: 11–9.
- Jain S, Jain S, Khare P, Gulbake A, Bansal D, Jain SK. Design and development of solid lipid nanoparticles for topical delivery of an anti-fungal agent. *Drug Deliv* 2010; **17**: 443–51.
- Souto EB, Muller RH. The use of SLN and NLC as topical particulate carriers for imidazole antifungal agents. *Pharmazie* 2006; **61**: 431–7.
- El-Laihy HM, El-Shaboury KM. The development of Cutina lipogels and gel microemulsion for topical administration of fluconazole. *AAPS PharmSciTech* 2002; **3**: 77–85.
- Madhu G, Amit KG, Shivani RP *et al*. Development and characterization of effective topical liposomal system for localized treatment of cutaneous candidiasis. *J Liposome Res* 2010; **20**: 341–50.
- Amnon CS, Shafir B. Transdermal drug delivery using microemulsion and aqueous systems: Influence of the skin storage conditions on the *in vitro* permeability of diclofenac from aqueous vehicle systems. *Int J Pharm* 2006; **311**: 55–62.
- Shafiq S, Faiyaz S, Sushma T, Farhan JA, Khar RK, Ali M. Design and development of ramipril nanoemulsion formulation: *in vitro* and *in vivo* assessment. *J Biomed Nanotechnol* 2007; **3**: 28–44.
- Indu PK, Shilpa K. Topical delivery of antifungal agents. *Expert Opin Drug Deliv* 2010; **7**: 1303–27.
- Scott RC, Glen SK. The effects of Pluronic block copolymers on the aggregation state of nystatin. *J Control Release* 2004; **95**: 161–71.
- Bolard J, Legrand P, Heitz F, Cybulska B. One-sided action of amphotericin B on cholesterol-containing membranes is determined by its self-association in the medium. *Biochemistry* 1991; **30**: 5707–15.
- Baboota S, Shakeel F, Ahuja A, Ali J, Shafiq S. Design, development and evaluation of novel nanoemulsion formulations for transdermal potential of celecoxib. *Acta Pharm* 2007; **57**: 315–32.
- Abismail B, Canselier JP, Wilhelm AM, Delmas H, Gourdon C. Emulsification by ultrasounds: drop size distribution and stability. *Ultrason Sonochem* 1999; **6**: 75–83.
- Luykx DM, Peters RJ, van Ruth SM, Bouwmeester H. A review of analytical methods for the identification and characterization of nano delivery systems in food. *J Agric Food Chem* 2008; **56**: 8231–47.
- Hayat MA. *Principles and techniques of electron microscopy. Biological applications*, 3rd edn. London: Macmillan Press, 1989: 251–3.
- Mengual O, Meunier G, Cayré I, Puech K, Snabre P. TURBISCAN MA 2000: multiple light scattering measurements for concentrated emulsion and suspension instability analysis. *Talanta* 1999; **50**: 445–56.
- Silva AC, González-Mira E, García ML *et al*. Preparation, characterization and biocompatibility studies on risperidone-loaded solid lipid nanoparticles (SLN): high pressure homogenization vs. ultrasound. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2011; **86**: 158–65.
- European Pharmacopoeia*, vol. 6.0, 6th edn, Antibiotics microbiological assessment. Strasbourg, France: Council of Europe, 2008: 224–5.
- Subcommittee on Antifungal Susceptibility Testing (AFST) of the ESCMID European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). EUCAST definitive document EDef 7.1: method for the determination of broth dilution MICs of antifungal agents for fermentative yeasts. *Clin Microbiol Infect* 2008; **14**: 398–405.
- Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Pfaller MA, Tenover FC, White

- 26 Llabot JM, Manzo RH, Allemandi DA. Novel mucoadhesive extended release tablets for treatment of oral candidosis: 'in vivo' evaluation of the pharmaceutical performance. *J Pharm Sci* 2009; **98**: 1871–6.
- 27 Aksungur P, Sungur A, Ünal S *et al.* Chitosan delivery system for the treatment of oral mucositis: *in vitro* and *in vivo* studies. *J Control Release* 2004; **98**: 269–79.
- 28 Sakeer K, Al-Zein H, Hassan I, Martin GP, Nokhodchi A. Use of xanthan and its binary blends with synthetic polymers to design controlled release formulations of buccoadhesive nystatin tablets. *Pharm Dev Technol* 2010; **15**: 360–8.
- 29 Llabot JM, Palma SD, Manzo RH, Allemandi DA. Design of novel antifungal mucoadhesive films. Part II. Formulation and *in vitro* biopharmaceutical evaluation. *Int J Pharm* 2007; **336**: 263–8.
- 30 *European Pharmacopoeia*, vol. 6.0, 6th edn. Strasbourg, France: Council of Europe, 2008: 2534–5.
- 31 Avachat A, Kotwal V. Design and evaluation of matrix-based controlled release tablets of diclofenac sodium and chondroitin sulphate. *AAPS PharmSciTech* 2007; **8**: 51–6.
- 32 Costa P, Sousa JM. Modeling and comparison of dissolution profiles. *Eur J Pharm Sci* 2001; **13**: 123–33.
- 33 Yamaoka K, Nakagawa T, Uno T. Application of Akaike's information criterion (AIC) in the evaluation of linear pharmacokinetic equations. *J Pharmacokinet Biopharm* 1978; **6**: 165–75.
- 34 Organisation for economic co-operation and development (OECD). *Guideline for the Testing of Chemicals. Draft Guideline 428: Skin absorption: in vitro method*. Paris: Environment Directorate, 2000.
- 35 European Centre for the validation of alternative methods (CVAM). Test guideline for skin absorption: *in vitro* method. Official Journal of the European Union Method B.45 of Annex to 440/2008/EC. Paris, France: European Commission, 2008.
- 36 Nangia A, Berner B, Maibach HI. Transepidermal water loss measurements for assessing skin barrier functions during *in vitro* percutaneous absorption studies. In: Bronaugh RL, Maibach HI (eds), *Percutaneous Absorption Drugs, Cosmetics, Mechanisms, Methodology*. 3rd edn. Drugs and the Pharmaceutical sciences. New York: Marcel Dekker Inc, 1999: 587–94.
- 37 van der Valk PGM, Kucharekova M, Tupker RA. Transepidermal water loss and its relation to barrier function and skin irritation, chapter 8. In: Fluhr J, Elsner P, Berardesca E, Maibach HI (eds), *Bioengineering of the Skin, Water and the Stratum Corneum*, 2nd edn. Boca Raton: CRC Press, 2005: 97–104.
- 38 Gonzalez-Mira E, Nikolic S, Garcia ML, Egea MA, Souto EB, Calpena AC. Potential use of nanostructured lipid nanocarriers for topical delivery of flurbiprofen. *J Pharm Sci* 2011; **100**: 242–51.
- 39 Venkateswarlu V, Manjunath K. Preparation, characterization and *in vitro* release kinetics of clozapine solid lipid nanoparticles. *J Control Release* 2004; **95**: 627–38.
- 40 Müller-Goymann K, Kriwet I, Eder I, Papantoniou I. Microemulsions and related systems for the dermal application of drugs. *Bull Tech Gattefosse* 1995; **88**: 43–54.
- 41 Balachandran S, Kentish SE, Mawson R, Ashokkumar M. Ultrasonic enhancement of the supercritical extraction from ginger. *Ultrason Sonochem* 2006; **13**: 471–9.
- 42 Solans C, Izquierdo P, Nolla J, Azemar N, Garcia-Celma MJ. Nano-emulsions. *Curr Opin Colloid Interface Sci* 2005; **10**: 102–10.
- 43 Barret JP, Ramzy PI, Hegggers JP, Villareal C, Herndon DN, Desai MH. Topical nystatin powder in severe burns: a new treatment for angioinvasive fungal infections refractory to other topical and systemic agents. *Burns* 1999; **25**: 505–8.
- 44 Semis R, Polachek I, Segal E. Nystatin-intralipid preparation: characterization and *in vitro* activity against yeasts and molds. *Mycopathologia* 2010; **169**: 333–41.
- 45 Johnson EM, Ojwang JO, Szekeley A, Wallace TL, Warnock DW. Comparison of *in vitro* antifungal activities of free and liposome-encapsulated nystatin with those of four Amphotericin B formulations. *Antimicrob Agents Chemother* 1998; **42**: 1412–6.
- 46 Gunderson SM, Hoffman H, Ernst EJ, Pfaller MA, Klepser ME. *In vitro* pharmacodynamic characteristics of nystatin including time-kill and postantifungal effect. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; **44**: 2887–90.

NANOEMULSIONES DE NISTATINA PARA APLICACIÓN EN CANDIDIASIS MUCO- CUTANEAS

CAPÍTULO 4. DEVELOPMENT AND CHARACTERIZATION OF A NOVEL NYSTATIN LOADED NANOEMULSION FOR THE BUCCAL TREATMENT OF CANDIDOSIS: ULTRASTRUCTURAL EFFECTS AND RELEASE STUDIES.

(Desarrollo y caracterización de una nueva
nanoemulsión de nistatina para el tratamiento de
candidiasis bucal: efectos en la ultraestructura y
estudios de liberación)

Fernández Campos F; Clares Naveros B; Rodríguez Delgado G; Lopez Serrano O;
Calpena Campmany AC

Journal of Pharmaceutical Sciences (*In press*)

ARTÍCULO 2

RESUMEN

La candidiasis oral es una infección oportunista en pacientes que sufren mucositis (tras la administración de radioterapia y quimioterapia) y tienen que ser tratado para prevenir la invasión de otros tejidos. La nistatina es uno de los fármacos más prescritos para el tratamiento de esta patología, pero debido a sus propiedades físico-químicas, su formulación representa un reto.

El principal objetivo de este trabajo es el desarrollo y caracterización de un sistema de administración óptimo para el tratamiento potencial de candidiasis orales, evitando efectos adversos indeseables, así como toxicidad y una potencial absorción sistémica. La nanoemulsión fue desarrollada, evaluada y caracterizada.

Se ha formulado exitosamente una nanoemulsión estable con un tamaño de gota de 138 nm. Los parámetros de liberación fueron estimados utilizando diferentes aproximaciones matemáticas. La permeación a través de la mucosa oral porcina mostró que no se obtendrán efectos sistémicos. Estudios microbiológicos revelaron el aumento de la potencia antifúngica de la nistatina vehiculizada en la nanoemulsión. Además la evaluación de la ultraestructura de la mucosa bucal porcina por TEM, mostró un efecto inocuo sobre la microestructura de la mucosa.

Se puede, por tanto concluir, que la nanoemulsión de nistatina seleccionada en este estudio, puede ser potencialmente usada para el tratamiento de candidiasis asociada a mucositis.

Title

Development and characterization of a novel nystatin loaded nanoemulsion for the buccal treatment of candidosis: ultrastructural effects and release studies.

Authors

Fernández Campos F ¹; Calpena Campmany AC ¹; Rodríguez Delgado G ²; López Serrano O ²; Clares Naveros B ³

Affiliation

¹Biopharmaceutical and Pharmacokinetics Unit. Faculty of Pharmacy. University of Barcelona. Joan XXIII avenue s/n, 08028, Barcelona, Spain.

²Department of Chemical and Surfactant Technology, Institute of Advanced Chemistry of Catalonia Institute, (IQAC - CSIC), Jordi Girona Street 18-26, 08034, Barcelona, Spain.

³Pharmacy and Pharmaceutical Technology Department. Faculty of Pharmacy. University of Granada. Campus of Cartuja street s/n, 18071, Granada, Spain.

Corresponding Author

Beatriz Clares Naveros

Department of Pharmacy and Pharmaceutical Technology

Faculty of Pharmacy

University of Granada,

Campus of Cartuja

18071, Granada, Spain

Tel: +34 958 243904

Fax: +34 958 248958

E-mail: beatrizclares@ugr.es

ABSTRACT

Oral candidosis is a common opportunistic infection in patients suffering mucositis (after chemotherapy and radiotherapy administration) and must be treated to prevent other tissue invasion. Nystatin is one of the most prescribed drugs to treat this pathology, but due to its physicochemical properties its pharmaceutical-technological requirements make it a challenge. The purpose of this work was the development and characterization of an optimal nystatin delivery system for the potential treatment of oral candidosis avoiding undesirable side effects and toxicity of potential systemic absorption. A nanoemulsion was developed, evaluated and characterized. It has been formulated successfully as a stable nanoemulsion with a droplet size of 138 nm. Release parameters were estimated using different mathematical approaches, and from *ex vivo* permeation study results of nystatin through porcine buccal mucosa, it could be hypothesized that no systemic effects would happen. Microbiologic studies performed revealed an enhanced antifungal effect of the nystatin loaded nanoemulsion. Also the evaluation of the treated buccal mucosa ultrastructure by transmission electron microscopy methodology revealed a harmless effect. Thus, it could be inferred that the developed formulation could be potentially utilized for candidosis infection under mucositis conditions.

KEYWORDS: nystatin; nanoemulsion; candidosis; buccal; ultrastructure; mucosal drug delivery; formulation vehicle; mathematical model; image analysis; pharmacokinetics.

1. INTRODUCTION

Nystatin (Nys) is one of the most common antifungal drugs. It is a membrane-active polyene macrolide produced by *Streptomyces noursei* strains.¹ Currently, interest in Nys has reemerged because it has been formulated in liposomes and intralipid formulations for intravenous administration,^{2,3} trying to avoid toxicity related to systemic exposure.⁴ Despite these attempts, the main Nys indication continues being the treatment of cutaneous and mucosal fungal infections.⁵ *Candida* species are the main yeast capable of infecting the oral mucosa and *Candida albicans* the most common species isolated.⁶ Although healthy patients could suffer from oral candidosis, mainly caused by the treatment with oral antibiotics or corticosteroids, and dental prosthesis,⁷ immunocompromised patients are highly susceptible to infections caused by *Candida* as patients with AIDS or patients with immune dysfunction in cancer and autoimmune diseases or in cases with immunosuppressive agents administration as in organ and bone marrow transplantation surgery.⁸ Oral candidosis is not a lethal disease but must be treated to avoid chronicity, other tissue invasion or systemic infection.⁹ Nys has not only been used for the treatment of oral candidosis, but also for prophylactic purposes to prevent the systemic widespread of oral infection by *Candida* in immunocompromized patients.¹⁰ Other types of mucosa as vaginal mucosa could be affected by *Candida* (vaginal candidosis).⁷ Nys has been also used for the treatment of nasal and bronchial aspergillosis.¹¹

Otherwise, an excessive use of azole antifungal drugs as fluconazole, miconazole and clotrimazole, has increased the fungi resistances by multiple mechanisms. *Candida albicans* can develop azole resistance. Equally, *Candida glabrata* and *Candida krusei*, which are not uncommon pathogens in oral mucosa,¹⁰ are innately less susceptible to azoles than other *Candida* species. Contrary, the resistance to polyenes as Nys is rare. In contrast to azoles with only a fungistatic effect,¹² Nys has an antifungal and fungistatic activity.¹³ The molecular structure of Nys, showed in Figure 1, is characterized by the presence of a large lactone ring containing several double bonds¹⁴ revealing formulation challenges by being both amphiphilic and amphoteric, what contribute to its poor solubility in aqueous media¹⁵ what supports that an increasingly important area of pharmaceutical research is in finding safe and effective methods of solubilizing poorly soluble drugs.

The administration of Nys for oral candidosis treatment is made by oral suspension (100000 UI/mL) containing high sucrose and ethanol proportions. These excipients

could lead to local irritation, tooth decay and adverse reactions for diabetic patients. Recent studies have been carried out on mucoadhesive drug delivery systems to increase the residence time of Nys in the mucosa.¹⁶⁻¹⁸ Although this is a logical approach, in our opinion high and sustained Nys levels in mouth is not a determinant factor for the improvement of the treatment efficacy, due to Nys shows a marked post-antifungal effect.^{10,19}

Post-antifungal effect (PAFE) is defined as the delay (time) of the fungal regrowth persisting after a brief exposure to an antifungal agent. A Nys exposure of 30 minutes with a drug concentration of 0.25 to 1 times the minimum inhibitory concentration (MIC) value produced a PAFE with an average duration range from 3.1 to 6.3 hours in several *Candida* isolates.¹⁹ Owing to this fact, other pharmaceutical forms, different from mucoadhesive systems, can be used to tackle effectively oral candidosis, solving the oral suspension problems.

Nanoemulsions are transparent (translucent) dispersions of two immiscible phases, with a mean droplet size in the nanometric scale (from 20 to 200 nm).²⁰ They have been reported to be stable formulations against sedimentation or creaming and they are well known systems that enhance the solubility of lipophilic drugs.²¹ Nanoemulsions had been extensively utilized in chemical, pharmaceutical and cosmetic fields. From the pharmaceutical point of view, nanoemulsions possess improved transdermal and dermal delivery properties *in vitro* and *in vivo* over classical dosage forms.²² Nanoemulsions could improve the permeation across mucosa through a wide distribution due to the small droplet size or containing permeation promoters. Equally nanoemulsion itself accelerates the drug penetration into the tissue.²³ The adequate selection of the nanoemulsion components allows the development of formulations with harmless effect on the buccal mucosa contrary to mucoadhesive buccal devices. Due to its physicochemical properties, nanoemulsions are characterized by low viscosity²⁰ what aided achieving difficult-to-reach areas and distribute in the entire buccal surface. A survey of literature has not revealed any study in which Nys had been evaluated in a nanoemulsion. Equally, any reference has been found in which high pressure freezing fixation and cryo-substitution method were performed to visualize the oral mucosa.

Most investigations evaluate the *in vivo* Nys release quantifying its concentration in saliva as measurement of microbiologic efficacy.^{16,17} In contrast, this work has considered that Nys amounts retained in the oral mucosa, and not the amount diluted in

the saliva, can be more efficiently related to *Candida* MIC, providing accurate prediction of Nys efficacy.

Moreover the treated mucosa ultrastructure was studied. This evidence, would allow us to support the potential use of Nys nanoemulsion for treatment of candidosis associated to mucositis. Lack of histological studies of the mucoadhesive vehicle could not ensure its harmlessness in the buccal mucosa.

Based on these considerations, the major aims of the present study were: (i) the development and characterization of an optimal Nys delivery system for the treatment of oral candidosis avoiding undesirable side effects and toxicity of potential systemic absorption; (ii) to evaluate the nystatin loaded nanoemulsion antifungal effect; and (iii) to analyze the potential damage on the buccal mucosa ultrastructure.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1 Materials

Nys was purchased from Fagron Iberica (Barcelona, Spain). Highly purified diethylene glycol monoethyl ethyl ether EP/NF (Transcutol P[®]), polyglyceryl-6-dioleate (Plurol[®] oleique), triglycerides medium-chain EP/NF/JPE (Labrafac[®] lipophile), propylene glycol dicaprylocaprate EP and propylene glycol dicaprylate/dicaprate NF (Labrafac[®] PG) and caprylocaproyl macrogol-polyoxyl-8-glyceride (Labrasol[®]) were a kind gift from Gattefossé (Saint-priest, France). Caprylic/capric triglycerides (Miglyol[®] 812) and liquid Paraffin oil were purchased from Roig-Pharma (Barcelona, Spain). Propylenglycol, HPLC-grade methanol, N-dimethylformamide, acetonitrile and dimethylsulfoxide were obtained from Panreac (Barcelona, Spain). Double-distilled water was used after filtration in a Milli-Q[®] Gradinet A10 system apparatus (Millipore Iberica S.A.U.; Madrid, Spain). Dialysis cellulose membranes MWCO 12 KDa was purchased from Iberlabo (Madrid, Spain). Synthetic medium RPMI-1640, from Invitrogen (Madrid, Spain), and buffer 3-(*N*-morpholino)-propanesulphonic acid from Sigma-Aldrich (Madrid, Spain), were also used. Yeast controls were procured from ATCC (Manassas, VA).

2.2 Selection of the nanoemulsion formulation

Four commonly used oils, Labrafac[®] lipophile, Labrafac[®] PG, Miglyol[®] 812 and liquid Paraffin oil were screened for their properties to dissolve maximum amount of

Nys. An excess amount of Nys was added into clear screw thread glass vials that contained 1 g of each oil followed by vortex-mixing in a MELB1719 vortex (Merck Eurolab; Lutterworth, UK). Mixtures were shaken for 30 min at room temperature in a shaking water bath MP-5 (Julabo Labortechnik GmbH; Seelbach, Germany), followed by equilibrium for 12 hours at room temperature. Mixtures were then centrifuged at 10000 rpm for 10 min in a microcentrifuge Millifuge CT10 (Millipore Iberica S.A.U.; Madrid, Spain). Aliquots of supernatant were filtered through 0.45 µm membrane filter (Millipore Iberica S.A.U.; Madrid, Spain) and the excess of Nys was discarded. The filtered sample was then diluted with methanol:N-dimethylformamide:water (55:15:30 v/v/v) and the amount of Nys solubilized was analyzed using a validated high-pressure liquid chromatography (HPLC) method described in section (2.5). This assay was performed in triplicate.

The Nys nanoemulsion was selected by constructing pseudo-ternary phase diagrams. Three phase diagrams were constructed at (5:2), (1:1) and (2:5) fixed ratios to choose the best surfactant:co-surfactant composition. Mixtures of these components at different mass ratios from 2.5 to 95% of each component were prepared in glass vials. Forty-six different combinations were assayed in order to reach the maximum coverage ratio for the study and delineate the boundaries of phases formed. The preparation process of the pseudo-ternary phase diagrams was conducted by mixing the components according to geometric dilution and underwent sonication for 5 minutes and 200 W intensity in an ultrasonic bath p-selecta 514 (Vidrafoc, Barcelona, Spain). The selection of the nanoemulsion region was made by visual observation of the one-phase transparent combination, droplet size and its polydispersity index.

The preparation process of 10 g of the selected nanoemulsion was conducted as follows: Formulation was prepared by mixing the established amounts of oil, solvent and surfactant-cosurfactant mixture, according to geometric dilution, before adding the required amount of propylenglycol under magnetic stirring at room temperature. Subsequently Nys was dissolved into the pre-weighed vehicle at a concentration ratio of 0.4% w/w, by sonication method of the components in an ultrasonic bath, corresponding to its high solubilization capacity, forming the nanoemulsion and equilibrated for 12 h to detect possible precipitation risk of drug before their use in subsequent studies. The physico-chemical characterization of Nys nanoemulsion is reported below.

2.3 Physicochemical characterization

2.3.1 Droplet size and morphological examination

The droplet size of nanoemulsion was determined by Dynamic Light Scattering (DLS), with a Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Worcestershire, UK). DLS is a non-invasive, well established technique for measuring the size of molecules and particles typically in the submicron region, providing in parallel the width of size distribution expressed as polydispersity index. In order to corroborate the droplet size and to examine its morphology the nanoemulsion was observed by Transmission Electron Microscopy (TEM) with a Zeiss 902 CEM microscope (Zeiss, Barcelona, Spain). One drop of sample was deposited on copper grids covered with a layer of Formvar standing for 4 min. After, the grids were washed twice with distilled water. The grids were later stained with one drop of 2% uranyl acetate solution and allowed to dry for 5 min before examination under the electron microscope. In both cases, DLS and TEM, the samples were measured directly without previous dilution.

2.3.2 Stability assays

A technology based on the analysis of multiple dispersion of the light was used for predicting the physical stability of the developed formulations. The TurbiScanLab[®] (Formulation, L'Union, France) is an optical instrument that characterizes emulsions and dispersions. This instrument is able to detect destabilization phenomena much earlier than the operator's naked eye, especially for concentrated and optically thick media.

Each undiluted formulation (45 mL) was placed on a cylindrical glass measuring cell which was completely scanned by a reading head. The reading head consists of a pulsed near-infrared light source ($\lambda = 880\text{nm}$) and two synchronous optical detectors. The transmission detector receives the light transmitted through the sample (0° from the incident radiation), and the backscattering detector receives the light backscattered by the sample (135° from the incident radiation). The formulation in this study was translucent, therefore only transmission profiles were used to evaluate the physicochemical stability of the nanoemulsion. The reading head gathered the transmission data each $40\ \mu\text{m}$, three times over a period of 15 minutes. These measurements were performed at day 1 and after 15 days of storage at room temperature.

Besides stability studies, to evaluate the drug content in the nanoemulsion, 1 g of nanoemulsion was accurately weighed and dissolved in 25 mL of methanol:N-dimethylformamide:water (55:15:30; v/v/v). Nys content was analyzed by a validated high-performance liquid chromatography method, described in section 2.5.

Samples were evaluated 24 h and 30 days after preparation and were stored at room temperature. Values are reported as the mean \pm SD of six replicates.

2.3.3 Rheology

The formulation (0.4 mL) viscosity was determined without dilution at 25° C using a HAAKE Rheostress 1 rotational rheometer (Thermo Fisher Scientific, Madrid, Spain) with cone and plate geometry (diameter 35 mm and 2° angle) with a separation of 0.105 mm.

2.4 Antimicrobiological efficacy

Broth microdilution method was used to determine the minimum inhibitory concentration (MIC) of Nys loaded nanoemulsion and free Nys. Both, *Candida albicans* ATCC 10231 and *Sacharomyces cerevisiae* ATCC 9763 are proposed by the European Pharmacopoeia as control yeast to perform the anti-microbiological drug efficacy. The procedure was based on the European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) definitive document EDef 7.1.²⁴ This standard method provides a valid procedure for testing the susceptibility of glucose-fermenting yeast to antifungal agents by determination of the MIC. The MIC was defined as the lowest concentration of an antimicrobial agent that inhibited the growth of a microorganism. Broth microdilution is an easy performance, rapid and economical method, widely used in clinical laboratories. A synthetic medium RPMI-1640 2% G (RPMI-1640 with glutamine, pH indicator, without bicarbonate and glucose 2% (w/v) was used as working cultures. pH was adjusted to 7.0 with 1 M sodium hydroxide and final solution was filtered using a 0.22 μ m filter. Due to samples were not sterile, chloramphenicol was added to the RPMI at final concentration of 500 μ g/mL. This antibiotic does not interfere with the yeast development.²⁵ Yeasts were first cultured on Sabouraud dextrose agar at 35° C for 24 h before testing. The inoculums were prepared by suspending colonies in sterile distilled water to achieve the desired density equivalent to the 0.5 McFarland standard and counting in a Neubauer Chamber ($1-5 \times 10^6$ Colony Forming

Unit, CFU/ml). Working suspension was prepared by diluting the standardized suspension in sterile distilled water (1:10) to transfer $1-5 \times 10^5$ CFU/ml.

The test was performed using a 96-well microdilution plate. This microdilution plate was prepared by first adding to the wells ten dilutions from 25 to 0.0488 $\mu\text{g/mL}$ of Nys loaded nanoemulsion (wells 1 to 10, row A) and nanoemulsion without Nys (wells 1 to 10, row B) in RPMI-1640 double strength. Free Nys solution in DMSO was used as reference antifungal (wells 1 to 10, row C). The final concentration of DMSO comprised less than 1% (v/v) of the total solution concentration used for the experiment. Previous studies have shown no inhibition of fungal growth in the presence of DMSO when used at similar concentrations.¹⁰ Two additional wells for each row were prepared as controls, well 11 (growth control) containing inoculum and RPMI medium and well 12 well (drug-free medium control to check that no contamination took place) containing only RPMI medium double strength.

Subsequently, 100 μL of inoculum suspension was added to each well. After incubation for 24 h at 35° C the absorbance was measured at 595 nm using a microplate reader (Microplate Reader model 680, Bio-Rad, Madrid, Spain). The assay was done in triplicate

2.5 HPLC analysis

The amount of Nys in samples was quantified using a high-performance liquid chromatography (HPLC) validated according to international guidelines. All HPLC assays were performed isocratically at room temperature. The HPLC system consisted of a Waters 515 pump (Waters, Milford, MA) with UV-VIS 2487 detector (Waters, Milford, MA) set at 305 nm. A reverse-phase column (Kromasil 100, 5 μm , 15x0.46 cm) with a flow rate of 0.8 mL/min was used. The mobile phase consisted of a mixture of 1% acetic glacial acid, acetonitrile:water (40:60; v/v). The injection volume was 50 μL and total run time 8 minutes.

Stock solution of Nys (6.4 mg/mL) was prepared in dimethylsulfoxide. Working standards solutions were prepared daily by suitable dilutions in Transcutol P[®], for the quantification in permeation studies and in methanol:N-dimethylformamide:water (55:15:30; v/v/v) for the quantification in release studies. Two calibration curves were prepared and validated inter-day (n = 6), one for the quantification of high Nys concentrations, which contained six standards between 32 and 1 $\mu\text{g/mL}$, and for

quantification of low Nys concentrations from 2 to 0.0625 µg/mL. Linear relationship between peak area and concentrations of both calibration curves was statistically confirmed by applying one-way ANOVA of the response factor ($p > 0.05$). The precision of the analytical method, expressed in percentage of variation coefficient (%CV) ranged between 0.78% and 17.83%. Its accuracy expressed as percentage of relative error (%RE) ranged from -5.50 to 18.82%. Finally the lower limit of quantification was set at 0.0625 µg/mL (%CV = 17.83% and RE% = 18.82%).

2.6 Nanoemulsion release studies

The release studies were performed using vertical Franz diffusion cells (FDC 400, Crown Glass, Somerville, NJ) with dialysis cellulose membranes (MWCO 12 KDa) between the donor and the receptor compartments. The effective diffusional area was 2.54 cm² and the receptor compartment capacity was 12 mL, which was filled with methanol:N-dimethylformamide:water (55:15:30; v/v/v). Dimethylformamide had been utilized by others authors in dialysis membranes.²⁶ This receptor medium allows keeping sink conditions in the whole experiment. In this way, the released Nys would be soluble in the receptor medium, contrary to other investigations, in which water as release medium was utilized, where Nys is practically insoluble. The system was kept at 37 ± 0.5° C to mimic *in vivo* mucosa conditions and stirred continuously at 600 rpm. 125 µL of the Nys loaded nanoemulsion (0.4%; w/w) equivalent to 500 µg of Nys was added to the donor compartment. 200 µL samples were withdrawn at selected time intervals for 55 h and were replaced with the same volume of fresh receptor medium. The concentration of released drug was measured as previously described (section 2.5). Values are reported as the mean ± SD of the six replicates.

2.6.1 Pharmacokinetics parameters

Five different kinetic models (zero order, first order, Peppas-korsmeyer, Higuchi and Weibull function) were used to fit the experimental data obtained in the drug release experiments.²⁷

$$\%R_t / \%R_\infty = k \times t \quad \text{Zero order} \quad (1)$$

$$\%R_t / \%R_\infty = 1 - e^{-K \times t} \quad \text{First-order} \quad (2)$$

$$\%R_t / \%R_\infty = k \times t^{1/2} \quad \text{Higuchi's equation} \quad (3)$$

$$\%R_t / \%R_\infty = 1 - e^{-(t/td)^\beta} \quad \text{Weibull's equation} \quad (4)$$

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

where $\%R_t$ is the percentage drug released at time t , $\%R_\infty$ is the total percentage drug released, $\%R_t / \%R_\infty$ is the fraction of drug released at time t , k is the release rate constant, n is the diffusion release exponent that could be used to characterize the different release mechanisms; $n \leq 0.43$ (Fickian diffusion), $0.43 < n < 0.85$ (anomalous transport), and $n \geq 0.85$ (case II transport; i.e. zero-order release), t_d is the time in which the 63.2% of the drug is released and β is the shape parameter.

A nonlinear least-squares regression was performed using the WinNonLin[®] software (WinNonlin[®] Professional edition version 3.3, Pharsight Corporation, CA), and the model parameters calculated. Also the Akaike's Information Criterion was determined for each model as it is an indicator of the model's suitability for a given dataset.²⁸ The smaller the value of Akaike's Information Criterion, the better the model adjusts the data. For the model selection the parameter accuracy was also taken into account expressed as % coefficient of variation (%CV) and the residual distribution plots.

2.7 Ex vivo Permeation Experiments in Porcine Mucosa

3-4-month-old male and female pigs were purchased from the Animal Facility at Bellvitge Campus of Barcelona University (Barcelona, Spain). Immediately after the animals ($n = 6$) were sacrificed using an overdose of sodium thiopental anaesthesia, the buccal mucosa was surgically removed from the cheek region in order to be more representative. The excised tissues were transported to the laboratory in containers filled with Hank's liquid (Krackeler Scientific Inc. Albany, NY). The protocol of the study was approved by the Ethical Committee of Barcelona University.

For the permeation studies, the fresh porcine buccal mucosa was cut into 500 ± 50 - μm -thick pieces by using an Aesculap GA 630 dermatome (Aesculap, Tuttlingen, Germany). This thickness corresponds to buccal epithelial thickness, which contributes to the diffusion barrier.²⁹ The membranes were then mounted in specially designed membrane holders with a permeation orifice diameter of 9 mm (diffusion area: 0.63 cm^2).

Using the membrane holder, each porcine buccal membrane was mounted between the donor (1.5 mL) and the receptor (6 mL) compartments of static Franz-type diffusion cells (Vidra Foc, Barcelona, Spain) with six replicates.

Prior to conducting the experiments, the diffusion cells were incubated for 1 h in a water bath to equalize the temperature in all cells ($37 \pm 1^\circ \text{C}$). Each cell contained a

small Teflon[®] magnetic stir bar at 600 rpm which was used to ensure that the fluid in the receptor compartment remained homogenous during the experiments. Sink conditions were ensured in all experiments after testing the saturation concentration of Nys in the receptor medium. 125 μ L of Nys loaded nanoemulsion; equivalent to 500 μ g of Nys was placed in the donor compartment.

Samples of 300 μ L were withdrawn via syringe from the centre of the receptor compartment at regular time intervals: 0.25, 0.5, 1, 2, 4, and 6 h. The removed sample volume was immediately replaced with the same volume of fresh receptor medium.

At the end of the permeation study, the mucosa was removed from the Franz cells, cleaned with gauze soaked in a 0.05% solution of dodecyl sulphate and washed in distilled water. The permeation areas of the mucosa were cut and weighed. Nys contained in the mucosa was extracted with acetonitrile/water (80:20; v/v) mixture during 20 min under cold sonication in an ultrasound bath, the resulting samples were measured by HPLC yielding the amount of Nys retained in the mucosa.³⁰ Mucosa permeation parameters were calculated if applicable.

2.8 Electron microscopy of buccal mucosa

Oral mucosa samples coming from the nanoemulsion permeation experiment (section 2.7) were studied by transmission electron microscopy. To obtain control samples, oral mucosa membranes were placed in Franz diffusion cells for 6 hours at 37° C in contact with the receptor medium and Hank's solution in the donor compartment. Afterwards the oral mucosa samples were cut into approximately 2 mm \times 1 mm ribbons. The ribbons were fixed in 5% (w/v) glutaraldehyde in a 0.1 M sodium cacodylate buffer at pH 7.2. Then they were post-fixed in 0.2% (w/v) RuO₄ in a sodium cacodylate buffer at pH 6.8 with 0.25% (w/v) potassium ferrocyanide (K₄Fe(CN)₆). After 1 h, the RuO₄ solution was replaced by fresh RuO₄ to establish an optimal fixation. Ruthenium tetroxide is an excellent fixative for revealing the existence of some non OsO₄ fixed cellular compounds. RuO₄ has been used mainly to visualize extracellular saturated lipids in ultrastructural studies.³¹

After rinsing in the buffer, the tissue samples were cryofixed using the high pressure freezing (HPF) device at a temperature of -196° C and a pressure of 2100 bar in the Leica EM Pact device (Leica Microsystems, Vienna, Austria). Afterwards, the freeze-substitution was carried out in an AFS (Automatic Freeze Substitution) system (Leica Microsystems, Vienna, Austria). The tissue samples were cryosubstituted at -90 °C for

48 h using 100% methanol, containing 1% (w/v) osmium tetroxide (OsO₄), 0.5% (w/v) uranyl acetate and 3.0% (w/v) glutaraldehyde. After the 48 h substitution period, the temperature was raised to -50 °C, and the samples were washed 3 times in 100% methanol. Subsequently, the methanol solution was replaced gradually by the embedding medium, Epon (100%). This resin was replaced after 24 h and 48 h with a freshly made embedding medium. Finally, the samples were transferred into a mold containing Epon resin and were incubated for 48 h at -50° C under UVA radiation to facilitate polymerization. Ultra-thin sections were cut by using a Leica Ultracut UCT microtome (Leica, Vienna, Austria), transferred to formvar-coated grids and examined in a JEOL 100 transmission electron microscope (Jeol, Tokyo, Japan). Ten cryofixations and freeze-substitutions were carried out from each sample. Then, 10 control samples and 10 samples treated with nanoemulsion were cryofixed and freeze-substituted. On average, 10 overviews and approximately 30-40 detail electron micrographs for each freeze-substitution process were taken. These micrographs were evaluated by five independent investigators, of which three were kept blind to the sample treatment.

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1 Physicochemical characterization

3.1.1 Selection of the nanoemulsion

Results of the solubility of Nys in various oils are reported in Table 1. This study allows us to identify the suitable oil to load Nys into the formulations. In this case, Nys solubility was similar among them, but in Labrafac[®] lipophile was slightly higher (953.45 ± 23.54 µg/mL). But final selection among these oils would secondly be confirmed according to emulsification properties with other ingredients of the nanoemulsion. As Labrafac[®] lipophile showed a major emulsification area according to pseudo-ternary diagrams (Figures 2, 3, 4) this oil was finally selected as the oil phase for the formulation.

The selection of surfactant or co-surfactant in the development of a nanoemulsion is very important for the properties of the final formulation and it is governed by their emulsification efficiency. A proper hydrophilic lipophilic balance (HLB) leads to the formation of a stable formulation. In addition is important to consider that large

amounts of surfactants can induce tissue irritation.³² The non-ionic surfactant Labrasol[®] and as co-surfactant Plurol Oleique[®] were selected. This mixture has been reported to be optimal components in drug delivery vehicles for amphiphilic drugs.³³

In several studies the low-irritant property of Labrasol[®] in vehicles for topical application has been stated.³⁴ To facilitate Labrasol emulsification the co-surfactants based on polyglycerol fatty acid esters have been utilized.³⁴ The mixture Labrasol[®]-Plurol Oleique[®] at fixed ratio 5:2 was chosen.³⁵

Pseudo-ternary diagrams were constructed with the objective to study the relationship between the phase behaviour and the composition of the surfactant:co-surfactant mixtures. Pseudo-ternary phase diagrams also help to determine the concentration range of components for the formation of a nanoemulsion. In Figures 2, 3 and 4 the nanoemulsion region are represented by the shady area at different surfactant:co-surfactant proportions; 2:5 (Figure 2), 1:1 (Figure 3) and 5:2 (Figure 4). In view of current investigation, due to larger nanoemulsion region the 5:2 system was selected. Further, nanoemulsion formulation was selected among this zone of nanoemulsion formation from the pseudo-ternary phase diagram resented by the red point. The composition and percentage of each component was: Labrafac[®] lipophile (25%) as oil phase, Transcutol P[®] (15.42%) as solvent, Labrasol[®] (35.42%) was the o/w surfactant (HLB 14), Plurol[®] oleique (14.16%) the w/o co-surfactant (HLB 6) and propylenglycol (10%) as hydrophilic phase.

Due to the incorporation of an oily phase the Nys loaded nanoemulsion would provide additional advantage over other delivery systems in mucositis conditions, because the treatment of mucositis involves administration of lubricants.¹⁷ The oil phase of the formulation could operate as an additional alleviation for the painful mucosa.

3.1.2 Size and morphological characterization

The selected nanoemulsion was transparent and monophasic, its droplet size ($n = 6$) determined by Dynamic Light Scattering was 138 ± 22 nm with a polydispersity index of 0.189 ± 0.045 . TEM images allowed the observation of the droplet structure in all formulations, and confirmed the efficiency of the nanoemulsion preparation method used. The diffusion of the staining agent used (uranyl acetate at 2%) reveals the existence of a transparent area on electron bombardment (areas which the staining agent has not been able to reach) and electrodense areas which denote the presence of heavy metal. For this reason, the oil phase or external hydrophobic phase of the nanoemulsions

behaves as though transparent, whilst the polar droplets, inside the previous one, correspond to the electrodense areas, which appear dark to us. All confirmed that a W/O nano-emulsion was obtained.

Nanoemulsions droplets were spherical, with sizes ranging between 100 and 200 nm (Figure 5). These results were in accordance with DLS findings and results reported by other authors for these systems.³⁶ No aggregation process was observed.

3.1.2 Stability assays

There are many different methods available for the analysis of the stability of the formulations. TurbiscanLab[®], is an optical analyzer instrument used to detect destabilization phenomena of the formulation during 15 days period. The principle of TurbiscanLab[®] is based on the measurement of backscattering and transmission signals, resulting from fluctuations on particle volume and size, meaning migration or particle aggregation phenomena, respectively. Furthermore, it provides information about the type of destabilization process going on: particle migration (creaming or sedimentation) and particle size variation (flocculation or coalescence), a reversible and an irreversible process, respectively. When sedimentation process is produced, a transmission decrease versus time at the bottom of the sample is observed. When the sample suffers a creaming process, a decrease of transmission versus time on the top of the vial is observed. If the destabilization phenomenon occurs due to particle aggregation, a backscattering increase versus time can be observed over the whole height of the sample.³⁷ If transmission profiles have a deviation of $\leq \pm 2\%$ it can be considered that there are no significant variations on particle size. Variations up to $\pm 10\%$ indicate instable formulations.

In comparison to classical stability measurements, this new technique allows assessing the physical stability avoiding the dilution of the formulation. Other important advantage is the ability to detect destabilization phenomena much earlier than the naked eye's operator. So it is considered a device which predicts the long term stability, being able to detect the formula destabilization before than the classical stability methods.

Figure 6 shows the transmission profiles of the nanoemulsion 24 h and 15 days after production. The left side of the curve corresponds to the bottom of the vial, whereas the right side corresponds to the sample behaviour on the top of the vial.

Transmission signal superimposition of day 1 and day 15 show the sample stability along time. Therefore no sedimentation or creaming processes were observed, as

expected, because of the stability properties of nanoemulsions.²⁰ The transmission peak at the top and the bottom of the vial corresponds to the meniscus made by the sample in contact with the glass.

The drug content in the formulation was found to be maintained ($99 \pm 0.5\%$). No significant changes over time (30 days) were observed in the formulation ($p > 0.10$).

3.1.3 Rheology

The nanoemulsion showed a viscosity value of 24.02 ± 1.02 mPa s and behaved as a Newtonian fluid. These data are in agreement to other nanoemulsions,²² as expected, because very low viscosity value is one of the characteristics of nanoemulsions.²⁰ This rheological behaviour makes possible nanoemulsion administration as mouthwash or as oral or nasal spray, being able to deliver the drug in hard-to-reach anatomical areas as soft palate, posterior portion of the mouth, pharynx, etc.

It could be another advantage of the Nys loaded nanoemulsion in the potential treatment of mucosa candidosis. Contrary to mucoadhesive delivery systems that are attached to a limited mouth area its influence site is restricted. Candidosis does not have a specific location in the mouth, but it is usually disseminated in the oral cavity. Only being released in the saliva from a potential mucoadhesive device the drug could reach the entire mouth surface. However, under mucositis conditions the flow of saliva is dramatically reduced and the drug could hardly achieve all the affected oral mucosa surfaces. Additionally, under mucositis conditions the clearance effect of saliva is also reduced, what would allow an increase in the contact time of the Nys loaded nanoemulsion with the infected regions of the oral cavity. On the other hand, mucoadhesive systems could alter the underlying mucosa by occlusion.

3.4 Antimicrobiological efficacy

The broth microdilution method was used to assess the *in vitro* antifungal activity of Nys loaded nanoemulsion against two yeast, *Candida albicans* ATCC 10231 and *Sacharomyces cerevisiae* ATCC 9763. MIC values from the *in vitro* susceptibility test are reported in Table 2 after 24 h.

In any case, the nanoemulsion excipients showed no inhibitory effect on the yeast growth, proving that no interferences took place. The lower Nys nanoemulsion values suggested that nanoemulsion enhanced the antimicrobial activity of Nys. This might possibly be explained by the better interaction of Nys within the nanoemulsion droplets

with the fungal cell membrane due to the excipient composition in the formulation. This enhanced antifungal activity compared with free Nys, was also observed by Semis et al.³ who prepared a lipid-based Nys emulsion for intravenous administration.

3.5. Nanoemulsion release study

Prior to the release study, the saturation solubility (C_s) of Nys in the mixture placed in the receptor compartment (metanol:water:N-dimethylformamide; 55:30:15; v/v/v) was determined to be 7.57 mg/mL at room temperature. During the release study, $C_1 < C_s \times 0.2$ was maintained, where C_1 is the final concentration of Nys in the medium if a complete release in the acceptor media was achieved, in compliance with sink conditions. The dialysis membranes did not exhibit any damage by the receptor medium after the experiment finalization.

The *in vitro* accumulated amounts of Nys were measured by HPLC. Taking into account the droplet size dialysis, correct molecular weight cut-off membranes were selected to allow the pass of Nys (926 Da) but prevented the pass of the nanoemulsion drops (membrane dialysis pore diameter was equivalent to 2.4 nm).³⁸ Figure 7 shows the release pattern of Nys from the nanoemulsion. In order to study the mechanism of Nys release from nanoemulsion, data obtained from the *in vitro* release study were fitted to various kinetic equations. The release curve of Nys loaded nanoemulsion fit very well to the first order kinetic model (Table 3), and thus, statistically, described the best release mechanism, with a slow release constant (K_d) value of 0.0898 h^{-1} ($CV = 12.59\%$) and a total release drug after 54.5h ($\%R_\infty$) of 15.26 % ($CV = 2.94\%$). This means that Nys release from nanoemulsion followed a concentration gradient pattern, based on the first Fick's law, where the released amounts are directly proportional to the amounts remaining into the dosage form offering a sustained drug release. Korsmeyer-Peppas exponent (n) has been typically used to describe the drug release mechanism from the dosage form. For a value of 0.388, in our case, confirms the Fickian drug release obtained under the first order kinetic assumption.³⁹

The determination of the release kinetic model is important during a formulation development. The mathematical modelling helps to gain insight into the release mechanism of a drug delivery system.⁴⁰ So these models are useful evaluating the excipients effect on the drug release and simulate different not assayed situations, being a potent tool which drives and accelerates the product development.⁴¹ The modelling also is utilized in quality control studies, because the drug release parameters are robust

to detect changes in the formulation over time. Finally, nowadays there are studies which correlate the biopharmaceutical system behaviour (regarding the drug release) with the pharmacodynamic effect. These complex models are being more important in predicting the time-course drug effects as a function of the drug release.⁴²

3.6 *Ex vivo* permeation experiments and amounts of drug remaining in porcine mucosa.

Ex vivo mucosa permeation studies were performed to determine the permeation profile of Nys nanoemulsion and its retained amounts in the mucosa tissue, which could be correlated with the efficacy of the treatment.

The mucosa tissue was kept in Hank's solution since it was extracted from animals until the experiment took place, approximately 1 hour. The buccal mucosa viability under different storage conditions has been reported by other authors.^{43,44} Nicolazzo et al.⁴³ demonstrated no tissue viability reduction until 12 hours post-mortem when mucosa was stored in Krebs Ringer Bicarbonate buffer until permeation experiment. The composition of this medium is very similar to Hank's solution. So the mucosa viability was maintained along the experiment.

No significant Nys amounts were found in the receptor compartment until the end of the experiment (6 h), the permeated amounts were very low (median 5.57 µg; max: 6.27 µg, min: 0 µg).

Therefore, in any case the flux of permeation and any other permeation parameter could be estimated. The data showed that no significant Nys concentrations would be found in blood. On the basis of the pharmacokinetics parameters of Nys⁴⁵ and the predicted steady-state plasma concentration of drug that would penetrate skin after topical application, that could be obtained using following equation:⁴⁶

$$C_{ss} = J \times S / Cl_p \quad (6)$$

Where C_{ss} is the plasma steady-state concentration, J the transmucosal flux, S is the hypothetical area of application and Cl_p the plasmatic clearance, the estimated flux required to achieve therapeutically concentrations should be higher than 1600 µg h/cm², far from the data presented in this work.

This finding could ensure that the treatment with this nanoemulsion would not have any toxic effect and would be safe, because Nys is very toxic after intravenous administration.⁴

Although the 25% of the oral mucosa has keratinized cells in the surface (masticatory mucosa: hard plate and gingival), there is a lack of a “real” stratum corneum.⁴⁷ So it continues being a diffusional barrier, as is demonstrated in the present experiment. The permeability barrier in non-keratinized epithelia consists of lipids located in the intercellular spaces of the superficial epithelia layer. These can limit the penetration of non-polar compounds, like Nys, which may become trapped in a non-lipid or in a fluid lipid intercellular compartment of the barrier layer. Thus, the surface layer of the epithelium may take up Nys relatively rapidly, and once saturated, this layer could not retain more material, regardless of the duration of exposure. Subsequently the penetrated amount of Nys diffuses into the deeper layers of the tissue at a constant rate that is more dependent on the capacity of the reservoir than on the duration of the surface exposure.⁴⁸ This fact, combined with high molecular weight of Nys made it difficult to penetrate through the oral mucosa. Another factor that should be taken into account regarding the poor Nys pass through the oral mucosa is the nanoemulsion composition. The selected nanoemulsion is composed of Transcutol P[®] (15.42%). This excipient seems to have a depot effect, increasing the drug retention in the skin.^{49,50} Thus, it could behave in the same way in oral mucosa, a fact that has not been previously declared.

Different extraction solvents mixtures were assayed, and acetonitrile:water (80:20; v/v) was chosen because it extracted the greatest amount of Nys from the mucosa (45.12%). The amount of Nys retained after 6 h of the nanoemulsion treatment was 244.88 µg per gram of tissue, equivalent to the 48.97% of the initial Nys dose placed in the receptor compartment.

Comparing the results from the drug release studies and the drug permeation studies the promoter effect of the nanoemulsion can be deduced. After 6 hours only the 6% of Nys was released from the nanoemulsion, but after 6 hours in the permeation study approximately 50% of the drug was found into the tissue. This improvement in the penetration could be due to the high thermodynamic activity of the nanoemulsion. Likewise, some of the formulation excipients were well known permeation promoters, as Transcutol[®] P and propylenglycol.²³

Nevertheless according to the MIC obtained from the antimicrobial susceptibility test (0.78 µg/mL, equivalent to 0.79 µg/g), the retained amounts of Nys in the mucosa was 310 times higher than the MIC value, more than enough to ensure its efficacy with a long PAFE effect. Previous studies have demonstrated that Nys exhibits a

concentration-dependent mechanism. From two to four times the MIC, Nys exhibits a rapid fungicidal activity, hence concentrations from 0.5 to two times the MIC a fungistatic activity is generally observed,¹⁹ thus with nanoemulsion treatment both mechanism would be achieved.

3.7 Electron microscopy of buccal mucosa

Microphotographs were taken to check if the nanoemulsion treatment caused any damage on the surface ultrastructure of the oral mucosa. Extensive survey of literature and patent databases did not reveal any reference in which high pressure freezing fixation and cryo-substitution method were performed to visualize the oral mucosa.

Figure 8 shows the microphotograph of the control mucosa (Hank's medium in the donor compartment) and Figure 9 the mucosa treated with Nys nanoemulsion.

Image 8A corresponds to the outer layer of the oral mucosa. The site of detachment of one surface cell is observed (arrow). Intercellular spaces of control mucosa were not widened (Figure 8A and 8C) and cells exhibited no cytoplasmic vesicles. These facts were similarly described for intact healthy mucosa in a previous work, in which healthy and damage mucosa were compared.⁵¹ These spaces are full of electron-dense material. Magnification (Figure 8B) lamellar structure similar as lipid skin stratum corneum is visualized.⁵² The outer border of the cell in Figure 8A is lined by a thickened plasma membrane and seems to be coated with filamentous substance (arrow), which represents the villi previously invaginated into one another and connecting individual cells.⁵³ In Figure 8C a cell of the granular layer which contains glycogen (thick arrow) and membrane-coating granules (thin arrow) can be visualized.

Figure 9A shows oral mucosa treated with Nys nanoemulsion. The granular layer is visualized in a similar way as was observed in the control sample. Membrane coating granules and tonofilaments are present in cytoplasmic areas. Dense-electron material is appreciated in the magnification (Figure 9B) which could correspond to desmosomes and extracellular lipids.

As in control samples the intercellular spaces of the treated mucosa were not widened and the cells exhibited no cytoplasmic vesicles. No differences in the integrity of the tissue and in the microstructures from control and treated mucosa were visualized. Therefore, we can conclude that Nys nanoemulsion has no significant effect on the mucosa ultrastructure.

The harmless effect of the formulation in the mucosa ultrastructure, let us hypothesize that nanoemulsion could be swallowed to treat possible esophageal and gastrointestinal candidosis, a common complication of oral candidosis. This evidence supports the information supplied by Gattefossé which pointed out that all the excipients used in the present nanoemulsion can be used to oral drug delivery systems. Moreover, as no systemic absorption was showed and tissue safety would be assured (according to ultrastructural study), this formulation could represent a viable option for the potential treatment of candidosis associated to mucositis conditions. In this case the mucosa permeability is increased, being the depot effect of Transcutol P[®] adequate to avoid the a eventual Nys systemic exposure.

4. CONCLUSIONS

Nystatin has been successfully included into a physically stable nanoemulsion (0.4% w/w), with a mean droplet diameter of 138 nm and narrow droplet size distribution. Microbiological assays have shown that the formulation is effective against *Candida albicans* infection at this concentration. Although the *in vitro* release rate was slow, the *ex vivo* penetration test through the oral porcine mucosa showed an adequate profile since no significant active amounts were found in the receptor medium. No systemic Nys concentration would be found with the nanoemulsion treatment and enough Nys amounts would be retained in the mucosa to have a fungicidal, fungistatic and PAFE effects. Moreover nanoemulsion showed no damage in mucosa ultrastructure allowing its potential use in mucositis over-infected with *Candida* species in an effective and safety way.

5. ACKNOWLEDGEMENT

We thanks to Gattefossé for the kindly excipient supply and formulation advices, to Dr. Elisabeth Gonzalez for the Physical Chemistry, Faculty of Pharmacy, University of Barcelona, Spain, for her useful advice regarding droplet size and stability measurements, to Dr. Carmen Lopez-Iglesias, Centre Scientific and Technical, University of Barcelona (CCiT-UB), Barcelona, Spain for her help with the microscopy techniques and Dr. Maria Elena Mercadé and Dr. Nuria Bozal from the Department of Microbiology, Faculty of Pharmacy, University of Barcelona, Spain, for their valuable contribution with the microbiological susceptibility test.

6. REFERENCES

1. Kaur IP, Kakkar S 2010. Topical delivery of antifungal agents. *Expert Opin Drug Deliv* 7:1303-1327.
2. Offmer F, Krcmery V, Boogaerts M, Doyen C, Engelhard D, Ribaud P, Cordonnier C, de Pauw B, Durrant S, Marie JP, Moreau P, Guiot H, Samonis G, Sylvester R, Herbrecht R 2004. Liposomal nystatin in patients with invasive aspergillosis refractory to or intolerant of amphotericin B. *Antimicrob. Agents Chemother* 48:4808-4812.
3. Semis R, Polacheck I, Segal E 2010. Nystatin-intralipid preparation: characterization and in vitro activity against yeasts and molds. *Mycopathologia* 169:333-341.
4. Johnson EM, Ojwang JO, Szekely A, Wallace TL, Warnock DW 1998. Comparison of in vitro antifungal activities of free and liposome-encapsulated nystatin with those of four amphotericin B formulations. *Antimicrob Agents Chemother* 42:1412–1416.
5. Richardson MD, Warnock DW. 2003. Antifungal drugs. In: Richardson MD, Warnock DW, editors. *Fungal infection. Diagnosis and management*, Oxford: Blackwell Publishing. p 29-79.
6. de Aguiar MM, de Albuquerque RP, Marinho DS, Braga BR, Dornelas CB, Oliveira A, de Sousa VP, Torres SR, Alviano DS, Alviano CS, Cabral LM, Holandino C 2010. Oral sustained release nystatin tablets for the treatment of oral candidosis: formulation development and validation of UV spectrophotometric analytical methodology for content determination. *Drug Dev Ind Pharm* 36:594-600.

7. Lopez-Martinez R 2010. Candidosis, a new challenge. *Clin Dermatol* 28:178-184.
8. Perlroth J, Choi B, Spellberg B 2007. Nosocomial fungal infections: epidemiology, diagnosis and treatment. *Med Mycol* 45:321-346.
9. Ship J, Vissink A, Challacombe S 2007. Use of prophylactic antifungals in the immunocompromised host. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 103:S6e1- S6e4.
10. Ellepola ANB, Panagoda GJ, Samaranayake LP 1999. Adhesion of oral candida species to human buccal epithelial cells following brief exposure to nystatin. *Oral Microbiol Immunol* 14:358-363.
11. Arthur RR, Drew RH, Perfect JR 2004. Novel modes of antifungal drug administration. *Expert Opin Investig Drugs* 13:903-932.
12. Niimi M, Firth NA, Cannon RD 2010. Antifungal drug resistance of oral fungi. *Odontology* 98:15-25.
13. Recamier KS, Hernandez-Gomez A, Gonzalez-Damian J, Ortega-Blake I 2010. Effect of membrane structure on the action of polyenes: I. nystatin action in cholesterol and ergosterol-containing membranes. *J. Membrane Biol* 237:31-40.
14. Silva L, Coutinho A, Fedorov A, Prieto M 2006. Nystatin-induced lipid vesicles permeabilization is strongly dependent on sterol structure. *Biochim Biophys Acta* 1758:452-459.
15. Croy SR, Kwon GS 2004. Effects of pluronic block copolymers on the aggregation state of nystatin. *J. Control Release* 95:161-171.
16. Llabot JM, Manzo RH, Allemandi DA 2009. Novel mucoadhesive extended release tablets for treatment of oral candidosis: "in vivo" evaluation of the pharmaceutical performance. *J Pharm Sci* 98:1871-1876.

17. Aksungur P, Sungur A, Unal S, Iskit AB, Squier CA, Senel S 2004. Chitosan delivery system for the treatment of oral mucositis: in vitro and in vivo studies. *J Control Release* 98:269-179.
18. Llabot JM, Palma SD, Manzo RH, Allemandi DA 2007. Design of novel antifungal mucoadhesive films. Part II. Formulation and in vitro biopharmaceutical evaluation. *Int J Pharm* 336:263-268.
19. Gunderson SM, Hoffman H, Ernst EJ, Pfaller MA, Klepser ME 2000. In vitro pharmacodynamic characteristics of nystatin including time-kill and postantifungal effect. *Antimicrob. Agents Chemother* 44:2887–2890.
20. Solans C, Izquierdo P, Nolla J, Azemar N, Garcia-Celma MJ 2005. Nano-emulsions. *Curr Opin Colloid Interface Sci.* 10:102-110.
21. Shah P, Bhalodia D, Shelat P. 2010. Nanoemulsion: a pharmaceutical review. *Sys Rev Pharm* 1:24-32.
22. Baboota S, Shakeel F, Ahuja A, Ali J, Shafiq S 2007. Design, development and evaluation of novel nanoemulsion formulations for transdermal potential of celecoxib. *Acta Pharm* 57:315-332.
23. Kogan A, Garti N 2006. Microemulsions as transdermal drug delivery vehicles. *Adv Colloid Interface Sci* 123-126:369-385.
24. Subcommittee on Antifungal Susceptibility Testing (AFST) of the ESCMID European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) 2008. EUCAST definitive document EDef 7.1: method for the determination of broth dilution MICs of antifungal agents for fermentative yeasts. *Clin Microbiol Infect* 14:398-405.
25. Murray PR, Baron EJ, Jorgensen, JH, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC. 2003. *Manual of Clinical Microbiology*, 8th ed., Washington DC: ASM press. p 1880-1893.

26. Chaw CS, Chooi KW, Liu XM, Tan CW, Wang L, Yang YY 2004. Thermally responsive core-shell nanoparticles self-assembled from cholesterylend-capped and grafted polyacrylamides: drug incorporation and in vitro release. *Biomaterials* 25: 4297-4308.
27. Costa P, Sousa JM 2001. Modeling and comparison of dissolution profiles. *Eur J Pharm Sci* 13:123-133.
28. Yamaoka K, Nakagawa T, Uno T 1978. Application of Akaike's information criterion (AIC) in the evaluation of linear pharmacokinetic equations. *J Pharmacokinet Biopharm* 6:165-175.
29. Sudhakar K, Kuotsu K, Bandyopadhyay K 2006. Buccal bioadhesive drug delivery. A promising option for orally less efficient drugs. *J Control Release* 114:15-40.
30. Gonzalez-Mira E, Nikolic S, Garcia ML, Egea MA, Souto EB, Calpena AC 2011. Potential use of nanostructured lipid nanocarriers for topical delivery of flurbiprofen. *J Pharm Sci* 100:242-251.
31. Vanden Berge BAI, Swartzendruber VAB, Geest J 1997. Development of an optimal protocol for the ultrastructural examination of skin by transmission electron microscopy. *J Microsc* 187:125-133.
32. Lawrence MJ, Rees GD 2000. Microemulsion-based media as novel drug delivery systems. *Adv Drug Deliv Rev* 45: 89-121.
33. Djordjevic L, Primorac M, Stupar M, Krajisnik D 2004. Characterization of caprylocaproyl macrogolglycerides based microemulsion drug delivery vehicles for an amphiphilic drug. *Int J Pharm* 27:11-19.
34. Kreilgaard M 2001. Dermal pharmacokinetics of microemulsion formulations determined by in vivo microdialysis. *Pharm Res* 18: 367–373.

35. Gattefossé SA 1994. Microemulsions: formulation Guide, publication No PF9225 A, Saint-Priest Cedex, France.
36. Sonnevile-Aubrun O, Simonnet JT, L'Alloret F 2004. Nanoemulsions a new vehicle for skincare products. *Adv Colloid Interface Sci.* 108:145-149.
37. Celia C, Trapasso E, Cosco D, Paolino D, Fresta M 2009. Turbiscan lab expert analysis of the stability of ethosomes and ultradeformable liposomes containing a bilayer fluidizing agent. *Colloids Surf B-Biointerfaces* 72:155-160
38. Venkateswarlu V, Manjunath K 2004. Preparation, characterization and in vitro release kinetics of clozapina solid lipid nanoparticles. *J. Control Release* 95:627-638.
39. Peppas NA 1985. Analysis of Fickian and non-Fickian drug release from polymers. *Pharm Acta Helv* 60: 110–111.
40. Fu Y, Kao WJ 2010. Drug release kinetics and transport mechanisms of non-degradable and degradable polymeric delivery systems. *Expert Opin Drug Deliv* 7: 429–444.
41. Siepmann J, Peppas NA 2001. Modeling of drug release from delivery systems based on hydroxypropyl methylcellulose (HPMC). *Adv Drug Deliv Rev* 48: 139–157.
42. Moreno D, Zalba S, Colom H, Trocóniz IF, Tros de Ilarduya C, Garrido MJ 2009. Biopharmaceutic and pharmacodynamic modeling of the in vitro antiproliferative effect of new controlled delivery systems of cisplatin. *Eur J Pharm Sci* 37: 341-350.
43. Nicolazzo JA, Reed BL, Finnin BC 2003. The effects of various in vitro conditions on the permeability characteristics of the buccal mucosa. *J Pharm Sci* 92: 2399-2410.

44. Figueiras A, Hombach J, Veiga F, Bernkop-Schnürch A 2009. In vitro evaluation of natural and methylated cyclodextrins as buccal permeation enhancing system for omeprazole delivery. *Eur J Pharm Biopharm* 71: 339-345.
45. Groll AH, Mickiene D, Werner K, Petraitiene R, Petraitis V, Calendario M, Field-Ridley A, Crisp J, Piscitelli SC, Walsh TJ 2000. Compartmental pharmacokinetics and tissue distribution of multilamellar liposomal nystatin in rabbits. *Antimicrob Agents Chemother* 44: 950-957.
46. Calpena AC, Lauroba J, Sunol M, Obach R, Domenech J 1994. Effect of d-Limonene on the transdermal permeation of Nifedipine and Domperidone. *Int J Pharm* 103:179-186.
47. Patel VF, Liu F, Brown MB 2011. Advances in oral transmucosal drug delivery. *J Control Release* 153:106-116.
48. Squier CA, Kremer MJ 2001. Biology of oral mucosa and esophagus. *J Natl Cancer Inst* 29:7-15.
49. Mura P, Fauccia MT, Bramantia G, Cortib P 2000. Evaluation of transcutol as a clonazepam transdermal permeation enhancer from hydrophilic gel formulations. *Eur J Pharm Sci* 9:365–372.
50. Godwin DA, Kim NH, Felton LA 2002. Influence of Transcutol[®] CG on the skin accumulation and transdermal permeation of ultraviolet absorbers. *Eur J Pharm Biopharm* 53:23-27.
51. Guedes AC, Rotta O, Leite HV, Rios Leite VH 2002. Ultrastructural aspects of mucosas in endemic pemphigus foliaceus. *Arch Dermatol* 138:949-954.
52. Barbosa-Barros L, Barba C, Rodríguez G, Cócera M, Coderch L, López-Iglesias C, de la Maza A, López O 2009. Lipid nanostructures: self-assembly and effect on skin properties. *Mol Pharm* 6:1237-1245.

53. Hashimoto K, DiBella RJ, Shklar G 1996. Electron microscopic studies of the normal human buccal mucosa. *J Invest Dermatol* 47:512-525.

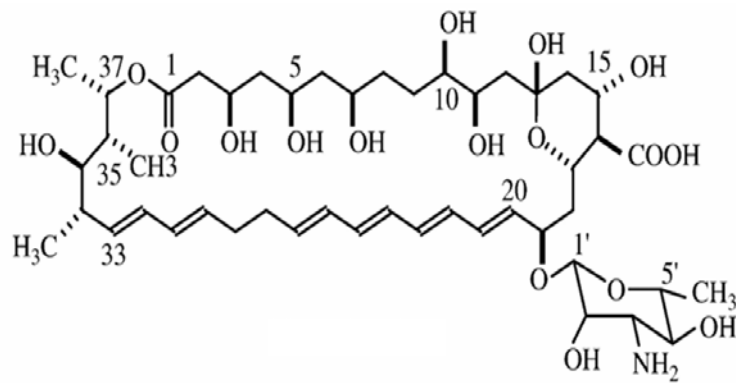


Figure 1. Chemical structure of nystatin.

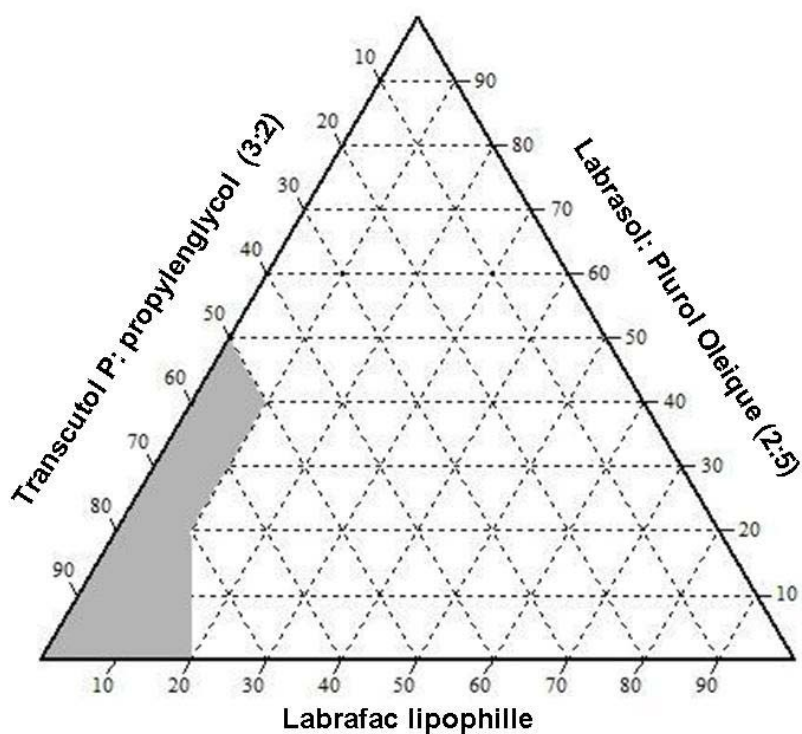


Figure 2. Pseudo-ternary phase diagram showing nanoemulsion region of Labrafac[®] lipophile, Transcutol P[®]:propylenglycol (3:2) and Labrasol[®]:Plurol[®] oleique (2:5).

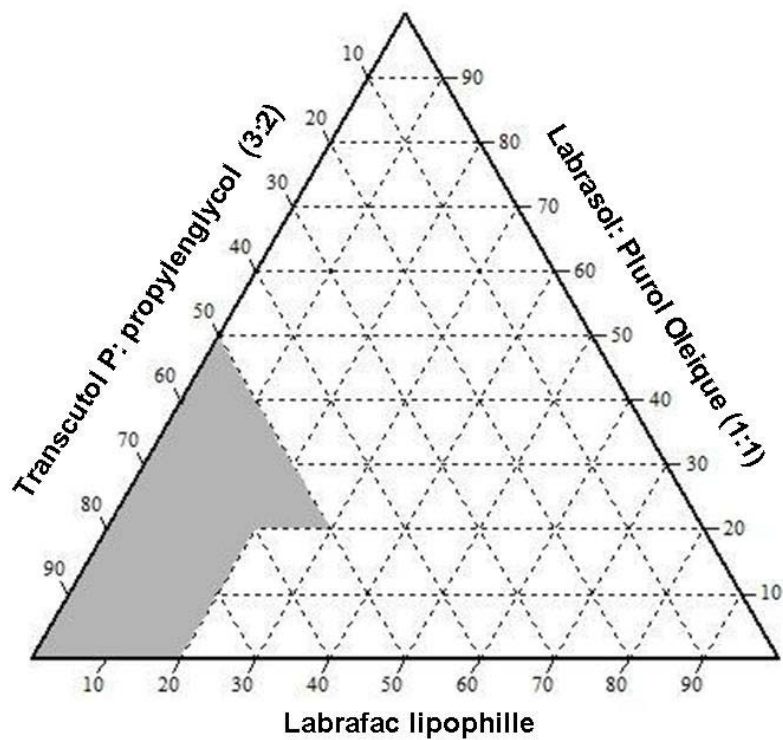


Figure 3. Pseudo-ternary phase diagram showing nanoemulsion region of Labrafac[®] lipophile, Transcutol P[®]:propylenglycol (3:2) and Labrasol[®]:Plurol[®] oleique (1:1).

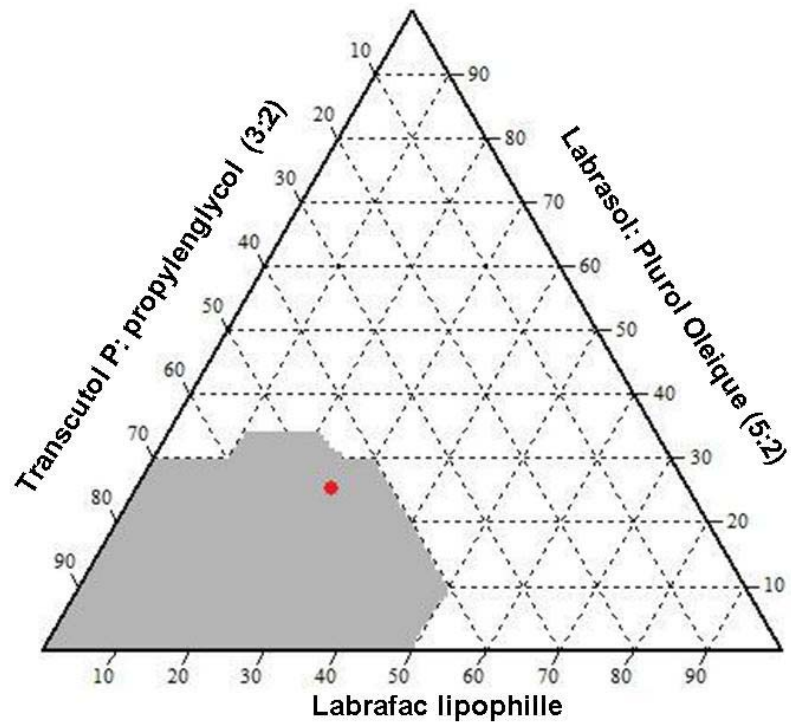


Figure 4. Pseudo-ternary phase diagram showing nanoemulsion region of Labrafac[®] lipophile, Transcutol P[®]:propylenglycol (3:2) and Labrasol[®]:Plurol[®] oleique (5:2).

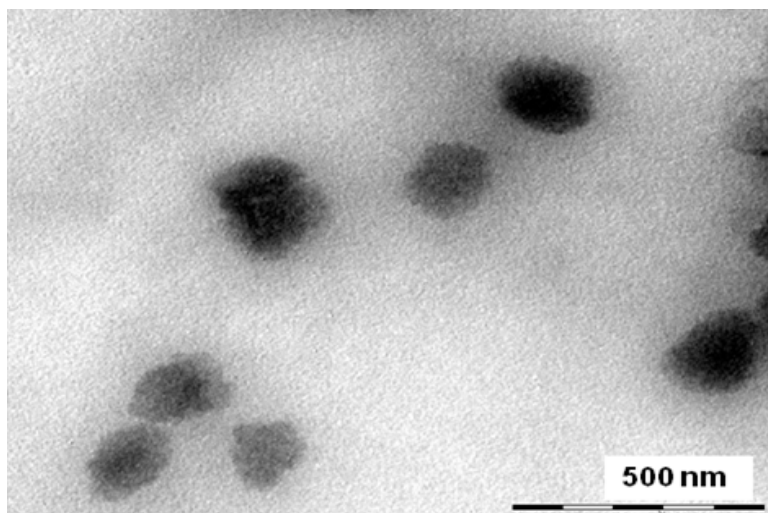


Figure 5. TEM images of the nystatin loaded nanoemulsion.

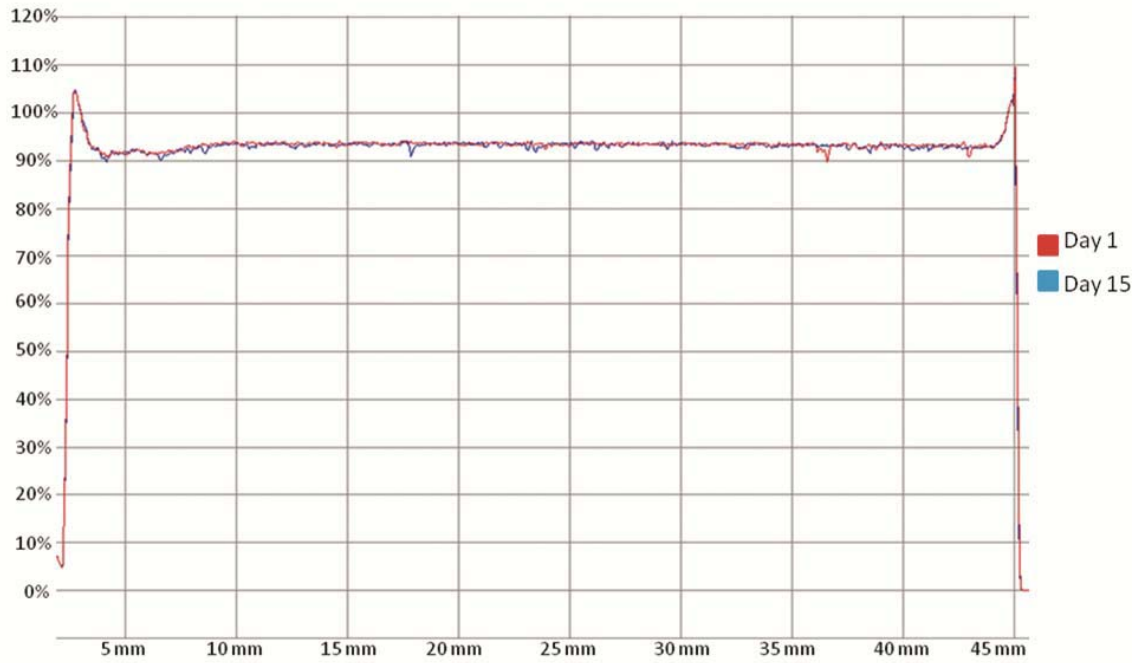


Figure 6. Superimposed transmission fingerprints of nystatin loaded nanoemulsion on day 1 (red) and day 15 (blue).

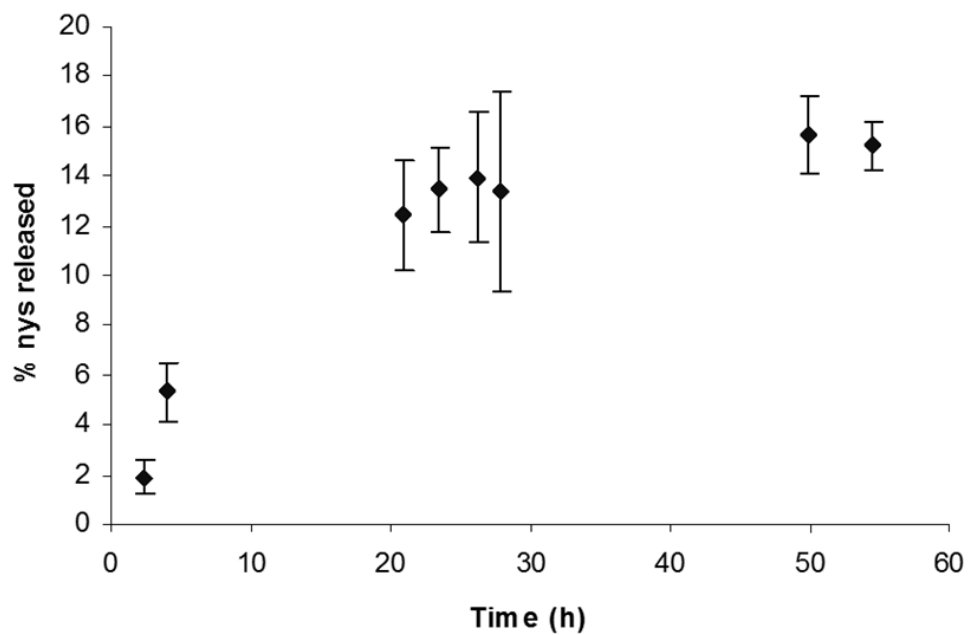


Figure 7. Mean release profile of nystatin (nys) from nanoemulsion and standard deviation (n=6) for 55 hours at 37 ° C.

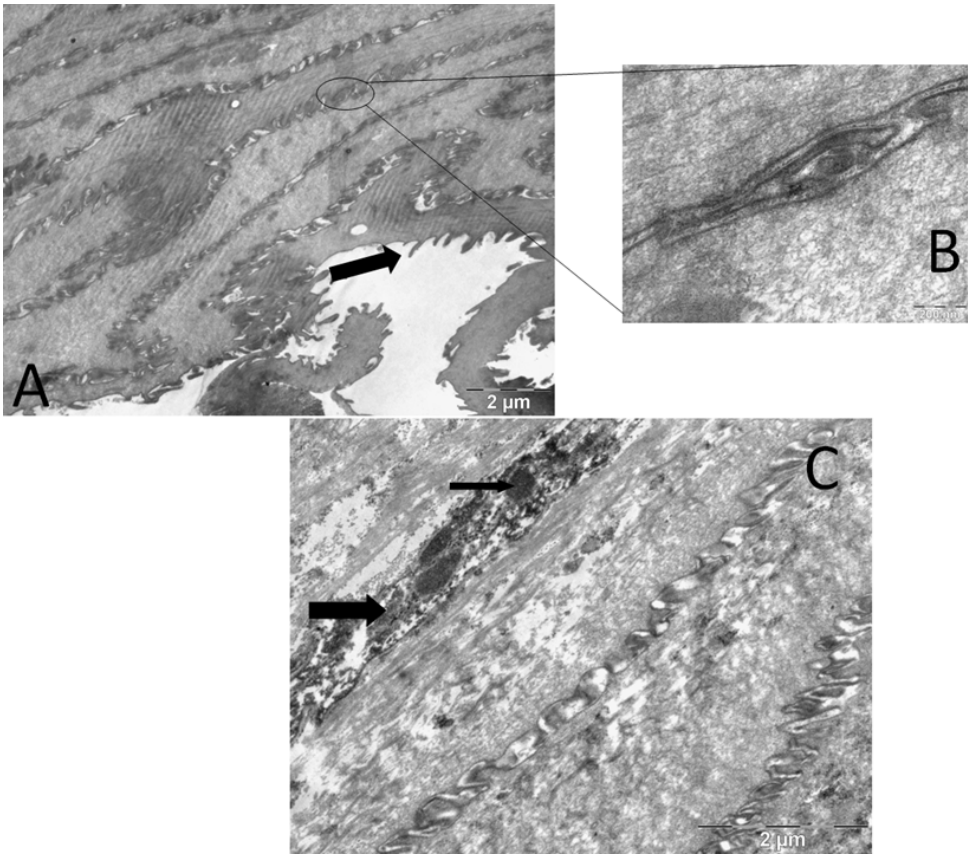


Figure 8. Ultrastructure of the control oral mucosa.

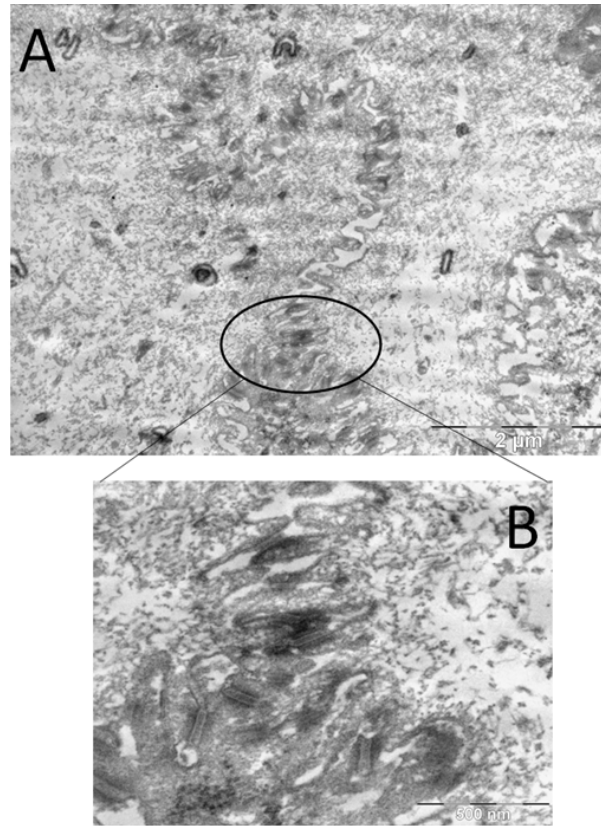


Figure 9. Ultrastructure of the oral mucosa treated with the nystatin loaded nanoemulsion.

Table 1. Mean solubility values of Nystatin in different oils.

Component	Solubility \pm SD ($\mu\text{g/mL}$)
Labrafac [®] lipophile	953.45 \pm 23.54
Labrafac [®] PG	909.10 \pm 51.22
Miglyol [®] 812	899.21 \pm 28.28
Liquid Paraffin oil	920.01 \pm 34.42

Results are shown as the mean value of three replicates \pm SD (n=3) at 25 \pm 1° C.

Table 2. Minimum Inhibitory Concentration values (n = 3) of free nystatin (Nys), Nys loaded nanoemulsion and nanoemulsion without Nys.

Formulation	<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	<i>Sacharomyces cerevisiae</i> ATCC 9763
Free Nys	1.56 µg/mL	0.78 µg/mL
Nys nanoemulsion	0.78 µg/mL	0.39 µg/mL
Nanoemulsion without Nys	-	-

Results are shown after incubation at 35° C for 24h.

Table 3. Mean parameters obtained after fitting the release data from the nystatin loaded nanoemulsion to different release models, where K is the release rate constant, $\%R_{\infty}$ is the total percentage drug released, n is the diffusional release exponent, t_d is the time in which the 63.2% of the drug is released, β is the shape parameter, CV is the coefficient of variation, and AIC is the Akaike's Information Criterion.

Kinetic model	AIC	Parameter	Unit	Value (CV%)
Zero-order	40.3058	K_0	$\% h^{-1}$	0.20 (25.47%)
		R_{∞}	%	5.83 (30.26%)
First-order	15.6700	K_d	h^{-1}	0.0898 (12.59%)
		R_{∞}	%	15.26 (2.94%)
Higuchi's square root	32.5901	K_h	$\% h^{-1/2}$	2.29 (5.21%)
Weibull	17.6780	t_d	h	10.55 (50.25%)
		β	-	0.947 (23.12%)
		R_{∞}	%	15.03 (2.35%)
Korsmeyer-Peppas	32.1750	K	$\% h^{-n}$	3.42 (28.25%)
		n	-	0.388 (20.24%)

NANOEMULSIONES DE NISTATINA PARA
APLICACIÓN EN CANDIDIASIS MUCO-
CUTANEAS

CAPÍTULO 5. DISCUSIÓN

La nistatina es un fármaco antifúngico que ha caído en desuso probablemente debido a sus adversas propiedades fisicoquímicas, así como biofarmacéuticas y farmacocinéticas (Croy y Kwon, 2004). A pesar de ello, la nistatina muestra un buen perfil de eficacia, ya que posee un amplio espectro de acción (Woo y cols. 2009) y un bajo índice de resistencias (Ellepola y Samaranayake, 2000). Presenta tanto actividad fungicida como fungistático y posee un marcado efecto post-antifúngico (PAFE) (Gunderson et al. 2000). Estas interesantes propiedades hacen que se haya retomado el esfuerzo en su formulación con el fin de mejorar el perfil terapéutico, mediante su inclusión en nuevas formas de dosificación. En los últimos años, fruto de la nanotecnología y su aplicación como vehículos de administración de fármacos se están realizando estudios con nistatina en formulaciones como liposomas (Kaur y Kakkar, 2010), niosomas (El-Ridy y cols. 2011), intralípido (Semis y cols. 2010), etc. cuyos resultados hasta el momento son muy prometedores. El interés por el desarrollo de nuevas formas de dosificación va en aumento. En este sentido cada día son más destacadas las nanoemulsiones como formas de dosificación para distintas vías de administración. Como ya se ha comentado anteriormente estas poseen una gran versatilidad en el campo farmacéutico (Devarajan y Ravichandran, 2011).

La nistatina se ha usado clásicamente para el tratamiento de infecciones fúngicas mucocutáneas. Existían formulaciones tópicas de aplicación dérmica (ungüentos y cremas), así como óvulos vaginales y comprimidos y suspensiones orales, de los cuales, en la actualidad solamente la suspensión oral esta presente en el mercado.

En base a los antecedentes anteriormente expuestos, pensamos que la vehiculización de nistatina en nanoemulsiones sería una potencialmente exitosa forma de dosificación para el tratamiento de infecciones fúngicas muco-cutáneas.

En este trabajo se ha elaborado sendas nanoemulsiones de nistatina, se han caracterizado y evaluado en términos de liberación, permeación y eficacia *in vitro*.

5.1. Formulación y caracterización de nanoemulsiones de nistatina

5.1.1. Selección y elaboración de las nanoemulsiones

Para la formulación de nanoemulsiones se han utilizado excipientes biocompatibles y seguros para su administración tópica. En primer lugar se ha seleccionado la fase oleosa en la cual la nistatina fuera más soluble. De entre todos los aceites probados el Labrafac lipophile[®] fue seleccionado, por su mayor solubilidad $953.45 \pm 23.54 \mu\text{g/mL}$, aunque la diferencia era poco relevante comparada con los otros aceites. Tras ello se selecciono el tensioactivo y co tensioactivos apropiados para la formulación de la nistatina. El Labrasol[®] y el Plurol oleique[®] han resultado ser uno de los compuestos más óptimos para la formulación de principios activo anfifílicos, como la nistatina (Djordjevic y cols. 2004). Adicionalmente, para facilitar la emulsificación del Labrasol[®], esteres de ácidos grasos y propilenglicol (Plurol oleique[®]) fue utilizado (Kreilgaard, 2001).

En cuanto a la fase acuosa se evito el uso de agua, dada la insolubilidad de la nistatina en esta, por lo que fue sustituida por un excipiente hidrófilo, propilenglicol en el caso de la nanoemulsión para la aplicación cutánea (N1) y propilenglicol:Transcutol[®] (2:3) para la nanoemulsión muco-bucal (N2). La adición de Transcutol[®] en la formula N2, se realizó debido al ya observado efecto depot que este compuesto presenta tras su administración cutánea (Muraa y cols. 2000; Godwin y cols. 2002). Ya que la mucosa oral es más permeable que la piel (Galey y cols. 1976), la adición de Transcutol[®] tuvo como objetivo frenar la posible entrada de nistatina a circulación sistémica tras su administración transmucosa.

Se elaboraron diagramas pseudo-ternarios a distintas proporciones tensioactivo/co-tensioactivo (Km) para determinar el área de formación de la nanoemulsión. La determinación de la región de formación del nanosistema se llevó a cabo, primeramente, mediante inspección visual del sistema. Se seleccionaron en primera instancia aquellas que tuvieran un aspecto monofásico y transparente. A estas se les evaluaba posteriormente en términos de tamaño de gota y polidispersión a través de DLS. En el diagrama pseudo-ternario (Figuras 2, 3 y 4, artículo 2) aparecen sombreadas las zonas en las que las nanoemulsiones poseían un tamaño de gota e índice de polidispersión (PDI) inferior a 200 nm y 0.2, respectivamente. Estas lecturas se realizaron a las 24 y 48h desde su elaboración. De todas las posibles combinaciones de componentes dentro de la zona de formación de la nanoemulsión se seleccionó aquella que contiene una

menor proporción de tensioactivo, ya que normalmente estos son los componentes que podrían ser más irritantes para piel y mucosa. Así pues se seleccionaron las nanoemulsiones N1 en el caso de la administración cutánea (Labrafac lipophile[®] 14.87%, Labrasol[®] 53.47%, Plurol oleique[®] 13.27%, propilenglicol 17.9%) y N2 para la administración en la mucosa oral (Labrafac lipophile[®] 25%, Labrasol[®] 35.42%, Plurol oleique[®] 14.16%, Transcutol[®] 15%, propilenglicol 10%). Finalmente la nistatina se añadió a la fase oleosa y los distintos componentes fueron mezclados en adición geométrica y sonicados.

5.1.2. Caracterización de las nanoemulsiones

5.1.2.1. Estudio geométrico (TEM y DLS)

N1: La incorporación de fármaco en la nanoemulsión puede modificar la nanoestructura del sistema debido a interacciones moleculares, especialmente cuando el fármaco tiene propiedades anfífilas (Müller-Goymann y cols. 1995). Por esa razón se caracterizó la nanoemulsión con nistatina y sin ella. Al cabo de las 48h post-preparación, la nanoemulsión sin nistatina presentó un tamaño de 72.68 ± 3.54 nm (PDI: 0.103) (Figura 2b, artículo 1) y la nanoemulsión cargada con nistatina presentó un tamaño de 77.11 ± 3.56 nm (PDI: 0.095) (Figura 3b, artículo 1), siendo el p-valor de las distribuciones muestrales mayor a 0.05, e indicando que no existían diferencias estadísticamente significativas entre ambos valores. En consecuencia, la adición de nistatina no modificó ni el tamaño ni la morfología del sistema. Al cabo de 30 días de la síntesis, ni el tamaño de gota, ni la morfología de la nanoemulsión (Figuras 2c y 3c, artículo 1) presentaron diferencias estadísticamente significativas ($p > 0.05$). En cambio, la discrepancia fue encontrada en las medidas e imágenes obtenidas a las 24h desde su elaboración. El tamaño de gota determinado mediante DLS en la nanoemulsión con nistatina y sin ella, fue muy alta y presentó un elevado PDI, indicativo de que existía una amplia distribución de tamaños. Es decir, no es que haya una única población de gotas de un tamaño en torno a 500 nm, sino que existe una amplia polidispersión de valores. Esto puede ser probablemente debido al proceso de sonicación al cual fueron sometidas la nanoemulsiones. A este respecto, es bien conocido el efecto que los ultrasonidos pueden tener sobre los fluidos (cavitación), causando numerosos efectos físicos como turbulencias y aglomeración de partículas (Balachandran y cols. 2006). Por otro lado el tensoactivo también puede producir coalescencia de las gotas recién

5. DISCUSIÓN

formadas debido a la colisión entre ellas cuando se utilizan métodos de elaboración de alta energía (Guglielmini, 2008).

Efectivamente, esta aglomeración fue confirmada mediante las imágenes de TEM (Figura 2a y 3a, artículo 1), siendo estos aglomerados los responsables del elevado tamaño de gota y PDI. Contrariamente a lo que cabría esperar, trascurridas 48h el tamaño de gota disminuye de forma drástica y las gotas de la nanoemulsión pasaron a una forma desagregada. Estado que se prolongo hasta los 30 días.

N2: esta nanoemulsión presento un tamaño ligeramente mayor a la N1, unos 138nm (Figura 5, artículo 2). La menor proporción del tensioactivo Labrasol® de la N2 (35.42%), respecto la N1 (53.47%) puede ser el responsable del mayor tamaño de gota encontrado en la formulación N2. Quizás se deba a la elevada proporción de tensioactivo hace que disminuya la tensión interfacial, permitiendo tamaños de gota mas pequeños (Kreilgaard, 2002).

Por otro lado, en el caso de la N2 no se observaron agregados a las 24h post-producción, ya que el proceso de sonicación en este caso se disminuyó a 5 min. Además la mayor proporción de co-tensioactivo contribuye a la estabilización del sistema y a la menor adición global de tensioactivo (posible responsable de la coalescencia de las gotas recién formadas, al ser sometida a un gran aporte de energía) (Guglielmini, 2008).

Las imágenes de TEM permiten clasificar, además, la estructura del sistema. En ambos casos, la difusión del agente de contraste utilizado (acetato de uranilo) revela la existencia de un área transparente al bombardeo electrónico, el la cual el colorante no es capaz de difundir (fase oleosa) y un área electrodensa que denota la presencia del metal pesado (fase hidrófila). Por esta razón podemos deducir que la que la nanoemulsión es de fase interna hidrófila.

5.1.2.2. Predicción de la estabilidad a largo plazo.

Hay varios métodos disponibles para evaluar la estabilidad de las formulaciones. El turbiscanLab®, es un instrumento óptico usado para evaluar fenómenos de desestabilización antes que el ojo humano y que otros métodos clásicos como la microscopia, espectroscopia y análisis de tamaño de partícula. Se considera que es un instrumento capaz de predecir la estabilidad a largo plazo. Otras ventajas de esta técnica

es que evita la manipulación y la dilución de la muestra, aportando información a tiempo real. Esta técnica es capaz de detectar el creaming en 20 minutos (cuatro veces antes que otras técnicas), la coalescencia en una hora (comparado con los tres días necesarios para su observación visual), la sedimentación tras el fenómeno de coalescencia en 12h (50 veces antes que el ojo humano) (Mengual y cols. 1999).

Cuando se produce un fenómeno de sedimentación la señal de transmisión decrece en el tiempo, en la parte baja del vial. Cuando la muestra sufre un fenómeno de creaming, se produce un descenso en la transmisión en el tiempo en la parte superior del vial. Si el proceso de desestabilización se produce mediante agregación, el backscattering aumenta en el tiempo a lo largo de todo el vial (Celia y cols. 2009). Si la señal de transmisión presenta una desviación $\leq \pm 2\%$, puede considerarse que no habrá diferencias significativas del tamaño de gota. Variaciones de un 10% indican inestabilidad de las formulaciones.

En el caso de las nanoemulsiones, como son sistemas transparentes, se seleccionó únicamente la transmitancia, para la evaluación de la estabilidad del sistema.

En el caso de la formula N1 se puede observar que la señal de transmitancia a los 30 días es mas plana comparada con la señal de las 24h post-preparación (Figura 4, artículo 1). Este hecho pudo deberse a la alta polidispersión encontrada para este tiempo (PDI=0.419) comparado con el dato a los 30 días (PDI=0.103). De la misma forma en las imágenes de TEM tomadas a las 24 h se observan los agregados anteriormente comentados, mientras que en la microfotografía de los 30 días estos agregados no aparecen.

En el caso de la N2 se realizaron medidas a las 24h y 15 tras su preparación (Figura 6, artículo 2). En base a los resultados obtenidos con la formulación N1, se optó por acortar el tiempo de ensayo de 30 a 15 días.

En el caso de la N2 las señales de transmitancia están prácticamente solapadas a las 24h y los 15 días.

De aquí se deduce que no se producen fenómenos de desestabilización en las formulaciones. Este hecho era de esperar ya que es una de las características de los sistemas en cuestión (Solans y cols. 2005).

Puntualizar, que los picos de transmisión en la parte superior e inferior del vial corresponden al menisco formado por el contacto de la muestra con el vidrio del vial.

5. DISCUSIÓN

Como medida de estabilidad también se cuantifico el contenido inicial de nistatina en la nanoemulsión y al cabo de 30 días. No se observaron diferencias estadísticamente significativas en el contenido del antifúngico nistatina en ninguna de las formulaciones. Puede deducirse por tanto que las nanoemulsión son buenos vehículos para proteger principios activos como la nistatina que se sabe que es termolábil y fotosensible (Eur. Pharmacopeia, 2008).

5.1.2.3. Comportamiento reológico

A las fórmulas adicionalmente, se las sometió a un estudio de viscosidad, ya que la estabilidad se encuentra íntimamente relacionada con éste parámetro (Eros y Thaleb, 1994)

La nanoemulsión N1 presentó una viscosidad de 85 mPa s, mientras que la N2 de 24 mPa s. Este hecho puede ser debido al Transcutol[®] de consistencia muy fluida. En ambos casos se trata de una viscosidad baja y de un fluido newtoniano. Estos resultados son similares a los encontrados por otros autores (Baboota y cols. 2007) y esperados, ya que la baja viscosidad es otra de las características de las nanoemulsiones (Solans y cols. 2005).

Los valores obtenidos de viscosidad las hacen adecuadas para su administración en forma de roll-on o spray, en el caso de la administración cutánea y de spray o colutorio en el caso de la administración bucal. La administración en forma de spray es interesante ya que permite llegar a las zonas de difícil acceso.

Por las mismas razones y debido a su pequeño tamaño de gota, estas nanoemulsiones pueden ser esterilizadas mediante filtrado por filtros de 0.22 µm, ya que la naturaleza termolábil de la nistatina (Eur. Pharmacopeia, 2008), no permitiría utilizar métodos térmicos. El hecho de que se puedan esterilizar es interesante para la aplicación dérmica de la fórmula N1. Las infecciones fúngicas son una complicación común en el caso de los grandes quemados (Still y cols. 1993). Al disponer de una formulación antifúngica estéril en forma de spray permitiría su fácil administración en grandes superficies corporales y evitaría el contacto con la piel para extender la formulación, evitando dolor y previniendo así posibles sobre-infecciones y la diseminación de los microorganismos (Barret y cols. 1999).

En el desarrollo de formulaciones para la administración de fármacos a través de la mucosa oral, los mucoadhesivos tienen una gran importancia. De hecho existen un alto

número de investigaciones basadas en este tipo de formulaciones que contienen nistatina para el tratamiento de candidiasis orales, con el fin de prolongar el tiempo de residencia del polieno con la mucosa oral (Llabot y cols. 2007; Llabot y cols. 2009; Sakeer y cols. 2010a; Sakeer y cols. 2010b).

A pesar de ser una aproximación lógica, en nuestra opinión el uso de la nanoemulsión N2 para el tratamiento de candidiasis orales puede ser potencialmente igual de efectiva que el uso de un mucoadhesivo (a la misma dosis). Creemos que la adhesión en la mucosa no es un factor crítico por las siguientes razones. Por un lado la nistatina posee un PAFE prolongado (Gunderson et al. 2000). Este es el responsable de un prolongado efecto antifúngico tras una exposición limitada al fármaco. Por otro lado, los mucoadhesivos están diseñados para situarse en un sitio específico de la cavidad bucal y liberarse ahí. Pero la candidiasis oral no se trata de una patología localizada, sino que se encuentra diseminada por toda la boca. La única forma para que la nistatina liberada por un mucoadhesivo este en contacto con toda la mucosa bucal sería mediante formulaciones con una doble cara de liberación (hacia la mucosa y hacia la cavidad bucal) de tal forma que la saliva sería la encargada de diseminar el fármaco por toda la boca. Creemos que el tiempo de permanencia que la saliva y la nanoemulsión puedan tener en la boca es el mismo. Por otro lado una de las potenciales indicaciones que la formulación de nistatina podría tener en un futuro sería el tratamiento de candidiasis orales asociadas a mucositis. Como se ha comentado anteriormente la mucositis es una patología inflamatoria de la mucosa oral, típico efecto secundario de la radioterapia de cabeza y cuello (Rashad y cols. 2009). Las radiaciones provocan una atrofia de las glándulas salivares, lo que reduce de forma drástica el flujo de saliva (Koc y Aktas, 2003). En este caso, en ausencia de saliva, la nistatina liberada por el mucoadhesivo no sería distribuida con la misma eficacia por toda la boca. En cambio esta condición permitiría aumentar el tiempo de residencia de la nanoemulsión en la cavidad bucal. Además, uno de los tratamientos que se administran en casos de mucositis son lubricantes, que proporcionan un alivio del dolor (Aksungur y cols. 2004). En este caso la naturaleza oleosa de la nanoemulsión N2 representaría una ventaja adicional.

5.2. Eficacia antifúngica *in vitro*

Para evaluar la eficacia antifúngica *in vitro* se determinó cual era la concentración mínima inhibitoria (MIC) de las formulaciones, comparado con la nistatina libre. La MIC se define como la concentración mas baja de un antibiótico capaz de inhibir el

5. DISCUSIÓN

crecimiento microbiano. Se ha utilizado el método de la microdilución, que consiste en realizar una serie de diluciones de los agentes antibióticos a ensayar en una placa de microtitulación. Se incuba el microorganismo en contacto con el medio de cultivo necesario y los productos a ensayar. Llegará un momento en el que las diluciones no tengan suficiente fuerza para eliminar al microorganismo, el pocillo justo anterior al primer pocillo de crecimiento microbiano es considerado la MIC. Este es un método rápido y sencillo, ampliamente utilizado en los laboratorios clínicos (EUCAST, 2008).

Se utilizaron dos levaduras *Candida albicans* ATCC 10231 y *Sacharomyces cerevisiae* ATCC 9763. Estos son los microorganismos de referencia de la Farmacopea Europea para el ensayo con nistatina (Eur. Pharmacopeia, 2008). El uso de *Sacharomyces* es también interesante debido a que *C. glabrata* está más relacionado filogenéticamente con *Sacharomyces cerevisiae* que con *Candida albicans* (Butler, 2010)

Debido a la insolubilidad acuosa de la nistatina, para testar la nistatina libre se elabora una solución stock de esta en DMSO (6.4mg/mL). Tras realizar una serie de diluciones, la concentración final de DMSO en todos los pocillos fue inferior al 1%. Esta concentración es compatible con el crecimiento de la levadura (Ellepola y Samaranayake, 1999b). Por otro lado, debido a que las muestras no eran estériles, al medio de cultivo se añadió cloranfenicol, a una concentración final de 500 µg/mL. En estas condiciones no se produce inhibición del crecimiento de la levadura (Murray et al. 2003).

Los resultados del ensayo muestran que la nanoemulsión N1 y N2 no inhiben el crecimiento del hongo, por lo que puede considerarse no tóxicas.

La MIC de la nistatina libre resulto ser 1.56 µg/mL para *Candida* y de 0.78 µg/mL frente a *Sacharomyces*. En el caso de la nistatina vehiculizada en las nanoemulsiones la MIC disminuyo en un grado en ambos casos. La MIC para la formulación N1 y N2 fue 0.78 µg/mL frente a *Candida* y de 0.39 µg/mL frente a *Sacharomyces*. A pesar de que es una diferencia baja, es un resultado consistente que se ha producido en los tres ensayos. Este hecho hace pensar que los propios excipientes de la formulación facilitan la interacción de la nistatina con la membrana del hongo. A una conclusión similar llego Semis y cols. (2010), quien preparó una formulación lipídica de nistatina y del mismo modo observó que la MIC de la nistatina era inferior a la de la nistatina libre. Esto hace pensar que la incorporación de nistatina en formulaciones oleosas aumenta la potencia de la nistatina. Debido a la falta de homogeneidad en los ensayos antimicrobiológicos publicados (distintas cepas de los hongos, así como diferentes condiciones

experimentales), los resultados de estos ensayos son difícilmente comparables a los descritos en la bibliografía.

5.3. Cuantificación de nistatina

Se utilizó y validó (EMEA, 2009) un método de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) para la cuantificación de nistatina en la formulación, en los estudios de liberación y permeación.

En un primer momento se utilizó el siguiente método:

Método isocrático cuya fase móvil consiste en una mezcla de metanol:Dimetilformamida(DMF):agua (55:15:30 v/v/v) que pasa a través de una columna Symmetry C18, 5 μ m, 15 x 0.46 cm, a 0.8 mL/min a temperatura ambiente. La longitud de onda de máxima absorción seleccionada de la nistatina fue 305nm. El volumen de inyección fue de 50 μ L y el tiempo total de cromatografía de 15 minutos. En este caso la solución stock de nistatina se preparó en DMSO a la concentración de 125 μ g/mL. Las rectas utilizadas para la cuantificación de nistatina en cada uno de los estudios, se realizó en el mismo solvente utilizado como medio receptor en cada ensayo. De esta forma se realizaron rectas en la mezcla metanol:DMF:agua (55:15:30 v/v/v), para los estudios de liberación, y contenido de fármaco en la formulación, y en Transcutol[®] P para los estudios de permeación con piel humana. El método fue validado inter-día (n=6) con rectas de seis estándares cuyo rango de concentraciones variaba entre 15.626 a 0.488 μ g/mL. Dentro de este rango se encontró una relación lineal entre las áreas de los picos cromatográficos y las concentraciones ensayadas, hecho que fue confirmado mediante la aplicación de un ANOVA de una vía, a los factores respuesta (áreas normalizadas por concentraciones), siendo en todos los casos el p-valor > 0.05, por lo que no se observaron diferencias estadísticamente significativas en los distintos niveles de concentración ensayados. Por otro lado también se determinó la exactitud y precisión del método de análisis, en términos de % de error relativo (%ER) y % de coeficiente de variación (%CV), respectivamente. Así pues los valores de CV variaron entre 1.24 y 11.61% y el ER vario entre 1.55 y 4.78%. El límite de cuantificación (LOQ) se estableció en 0.488 μ g/mL (CV = 11.61% y ER = 4.78%), definido como la concentración mas baja que puede ser cuantificable con precisión y exactitud suficientes (límite de CV y ER para el LOQ = 20%).

5. DISCUSIÓN

Posteriormente y con el fin de mejorar el método otras condiciones experimentales fueron probadas. En este caso se pretendió disminuir el tiempo total de cromatografía.

Tras realizar una exhaustiva búsqueda bibliográfica y probar distintos métodos se seleccionó el siguiente.

Se realizó una elución isocrática a temperatura ambiente utilizando una columna Kromasil 100, 5 μ m, 15x0.46 cm, con una fase móvil consistente en una mezcla de acetonitrilo:agua (40:60) con 1% de ácido acético glacial con un flujo de 0.8 mL/min. El volumen de inyección fue 50 μ L y el tiempo total de cromatografía de 8 minutos. Para ampliar el rango de concentraciones a cuantificar en los estudios de liberación y permeación se elaboraron y validaron inter-día (n=6) dos rangos de concentraciones distintos. Uno de 32 a 1 μ g/mL, para la cuantificación de concentraciones altas y otro de 2 a 0.0625 μ g/mL, para la cuantificación de concentraciones bajas. El método resultó ser lineal en ellos rangos de concentraciones ensayados, confirmado por la aplicación de un ANOVA de una vía entre los factores respuesta ($p > 0.05$). Los CV variaron entre 0.78 y 17.83% y los ER entre -5.50 y 18.82%. El límite de cuantificación se estableció en 0.0625 μ g/mL (CV = 17.83% y ER = 18.82%)

Este método consiguió ser más sensible que el anterior (LOQ 0.0625 μ g/mL, frente a 0.488 μ g/mL). Igualmente se consiguió disminuir el tiempo de cromatografía de 15 minutos (tiempo retención de nistatina 9 minutos) a 7 minutos (tiempo de retención de nistatina 4 minutos) con el consiguiente ahorro en el análisis. Por otro lado la nueva fase móvil utilizada solo tiene un 40% de disolvente orgánico (acetonitrilo), en cambio la anterior tenía un 70% de disolvente orgánico (metanol:DMF 55:15 v/v). Por último con este nuevo método se obtuvieron picos ligeramente más estrechos.

La mejora en las características cromatográficas de la nistatina en el segundo método utilizado puede ser debido a la ionización del fármaco (pK_a 12.65) en la fase móvil, que hace que exista una menor retención del compuesto en la columna.

La selección de la columna más idónea a veces resulta ser un proceso empírico. Dos columnas C18 con las mismas dimensiones (5 μ , 150x4.6mm), de dos procedencias distintas, pueden dar lugar a resultados diferentes, en términos de resolución, selectividad, eficiencia y forma del pico, tras la aplicación del mismo método de elución. Esto es debido a diferentes factores: la estructura de la sílica (el área y volumen del poro así como su distribución), la química de la sílica (frecuencia de

grupos silanoles, la acidez superficial) y grupos enlazados (tipo de grupo funcional, método de unión, concentración del grupo unido). Por tanto, pequeños cambios en la sílica proporcionan grandes diferencias. Así por ejemplo un aumento del área superficial y una mayor carga de carbono, aumenta el tiempo de retención, y una menor acidez superficial mejora la simetría del pico (Mac Mod analytical Inc. 2008)

5.4. Estudios de liberación

Previamente a los estudios de liberación se determinó la solubilidad de la nistatina en el medio receptor metanol:DMF:agua (55:15:30 v/v/v) (7.57 mg/mL) con el fin de comprobar que las condiciones sink se cumplen durante todo el experimento. Las condiciones sink permiten asegurar que la concentración máxima que puede encontrarse en el medio receptor a lo largo del experimento sea menor a un 20% la concentración de saturación del fármaco en ese medio. De esta forma podemos asegurar que la liberación del fármaco no se verá limitada por la solubilidad del mismo en el medio. Otros investigadores en cambio no tienen en cuenta este factor a la hora de realizar los experimentos de liberación de las formulaciones que contenían nistatina (Aguar y cols. 2010; Aksungur y cols. 2004; Llabot y cols. 2007; Llabot y cols. 2009; Sakeer y cols. 2010b). En estos se utilizaron soluciones acuosas como medio receptor, pero hay que tener en cuenta que la nistatina es prácticamente insoluble en ella (Eur. Pharmacopeia, 2008), por lo que los resultados de cantidades de nistatina liberadas en estos estudios deben ser tomados con cautela.

La membrana utilizada en el estudio de liberación fue una membrana de diálisis con un tamaño de poro de 12-14 kDa. La utilización de esta permite el paso de la nistatina (926 Da), pero impide el paso de las gotas de la nanoemulsión, ya que estas son mayores al tamaño de poro estimado para estas membranas de 2.4 nm (Venkateswarlu y Manjunath, 2004). Las cantidades disueltas acumuladas en el medio receptor fueron analizadas mediante HPLC.

Con el fin de determinar el mecanismo de liberación de la nistatina de las nanoemulsiones, el % de nistatina liberados en el tiempo fue ajustado a varios modelos cinéticos. La selección del modelo se realizó en base al menor valor de AIC (Criterio de información de Aikake) y en base a la precisión con la que se estimaron los parámetros de los modelos, expresado como coeficiente de variación. También se tuvo en cuenta los gráficos de bondad de ajustado.

5. DISCUSIÓN

La determinación de los modelos cinéticos de liberación son muy importante durante el desarrollo de una nueva formulación ya que nos proporciona una aproximación sobre los mecanismo de liberación (Fu y Kao, 2010). Estos modelos son útiles para evaluar el efecto que los excipientes tienen sobre la liberación, también son provechosos para hacer simulaciones de situación no ensayadas previamente, siendo un importante recurso que permite acelerar el desarrollo del fármaco (Siepmann y Peppas, 2001). La comparación de los parámetros cinéticos es útil también para cuestiones relacionadas con el control de calidad, ya que los valores de dichos parámetros son sensibles a cambio que se produzcan en la formulación en el tiempo. Adicionalmente, hoy en día existen estudios que correlacionan el comportamiento biofarmacéutico de la formulación (relativo a los parámetros que caracterizan la liberación del fármaco), con el efecto farmacodinámico *in vitro*. Así que mediante estos complejos modelos se podría llegar a predecir el efecto del fármaco en función de su liberación (Moreno y cols. 2009).

La cinética de liberación de la nistatina desde ambas nanoemulsiones, siguió un modelo de orden uno. La formulación N1 (Imagen 5, artículo 1) se obtuvo una constante de liberación (K_d) de 0.034h^{-1} (CV=12.71%) y el fármaco total liberado (% R_∞) fue 44.46% (CV=6.16%). En el caso de la formulación N2 (Imagen 7, artículo 2) los valores de estos parámetros fueron: $K_d=0.0898\text{ h}^{-1}$ (CV=12.59%) y $R_\infty= 15.26\%$ (CV=2.94%). De esto se desprende que la liberación de la nistatina desde la nanoemulsión esta gobernado por el gradiente de concentración existente entre la nanoemulsión y el medio receptor. Esta cinética esta basada en la primera ley de Fick, donde la cantidad de fármaco liberado es directamente proporcional a la cantidad de fármaco remanente en la forma farmacéutica.

El exponente n de la ecuación de Korsmeyer-Peppas, ha sido típicamente utilizado para explicar el mecanismo de liberación del fármaco. En el caso de la formula N1 el valor de este exponente fue de 0.405 y en el caso de la N2 este parámetro tomo un valor de 0.388. Ambos resultados confirman un mecanismo de liberación fickiano (Peppas, 1985) de la nistatina desde las nanoemulsiones.

A pesar de que ambas nanoemulsiones presentaron una cinética de liberación de orden uno, existen diferencias significativas en los valores de los parámetros obtenidos. La K_d de la formulación N2 ($K_d = 0.0898\text{ h}^{-1}$) fue casi dos veces y media superior a la K_d de la N1 ($K_d = 0.034\text{ h}^{-1}$). Este aumento de la constante de liberación puede ser debido a las condiciones experimentales ya que para mimetizar las condiciones *in vivo*, el

experimento de liberación con la N1 se realizó a 32°C (temperatura de la superficie de la piel) y el experimento con la N2 se realizó a 37°C (temperatura de la mucosa oral). Por otro lado también se pueden encontrar diferencias en las velocidades de liberación por el efecto de la viscosidad del vehículo. La viscosidad de la N2 es menor con respecto a la N1 (24 frente a 85 mPa s). Por lo que, cuanto mayor viscosidad presente el vehículo, menor será la velocidad de liberación del fármaco a partir del mismo (Kreye y cols. 2011). Por otro lado, la $\%R_{\infty}$ en la nanoemulsión N1 es menor que la de N2 (15.26% frente a 44.46%). Estas diferencias pueden ser atribuibles a la distinta composición de ambas nanoemulsiones. La adición de Transcutol[®] a la fase hidrófila de la N2 pudo aumentar el reparto de la nistatina entre las fases hidrófilas y lipófilas dentro de la nanoemulsión. El Transcutol[®] resultó ser un adecuado solvente hidrófilo para la nistatina. La nanoemulsión N1 no contenía Transcutol[®], por lo que la nistatina es menos soluble en la fase hidrófila en comparación con la nanoemulsión N2, que contiene Transcutol[®]. Es decir, el reparto de la nistatina entre la fase hidrófila y lipófila es mayor en el caso de la N2 frente a la N1. El fármaco contenido en las gotas de la fase hidrófila es menos susceptible a ser liberadas y debido a eso el $\%R_{\infty}$ es menor en el caso de la N2.

En las dos nanoemulsiones el porcentaje máximo liberado al final del ensayo fue relativamente bajo. Esto podría ser debido al uso de disolventes orgánicos en el compartimento receptor. Montenegro y cols (2008) observaron que el alcohol, en el caso de la utilización de disoluciones hidro-alcohólicas como medio receptor en los estudios de liberación *in vitro*, era capaz de atravesar la membrana artificial y llegar al compartimento donador, donde se encuentra la formulación. Según Junginger y cols (1994) la interacción de solventes orgánicos en sistemas como las emulsiones, puede cambiar la estructura del sistema y formar clusters o estructuras cristalinas que pueden atrapar el fármaco e impedir su liberación. Montenegro y cols. (2008) en sus experimentos de liberación *in vitro* con filtros solares, eliminaron el alcohol del medio receptor, dejando únicamente una solución acuosa, pero en este caso no se pudo evaluar el contenido de fármaco liberado ya que el activo no era soluble en el nuevo medio receptor, incumpliendo las condiciones sink. De aquí se desprende que es necesario el cumplimiento de las condiciones sink a pesar de que la utilización de solventes orgánicos en el medio receptor pueda modificar la cantidad máxima de fármaco liberado.

5.5. Ensayo de permeación en piel humana

Para evaluar la capacidad de penetración de la formulación N1, se utilizó piel humana como membrana de difusión. La piel fue obtenida de excedentes de lipoadectomias abdominales. Una vez obtenida la piel, esta se deposita en un contenedor con suero fisiológico y trasladado al laboratorio en menos de 24 h desde su extracción. La piel se acondicionó adecuadamente y se congeló a -20°C hasta su posterior uso. Como se ha indicado anteriormente la principal barrera a la difusión del fármaco cuando es administrado por vía transdérmica es el estrato corneo. Las variaciones que se producen en el estrato corneo tras este proceso de congelación, alteran poco la arquitectura del estrato corneo, así como los lípidos que contienen. En el día del experimento la piel fue descongelada y cortada con un espesor de $400\ \mu\text{m}$ (OECD, 2000). Con este espesor se garantiza la toma el estrato corneo y una zona de la dermis vascularizada con el fin de predecir si el fármaco será susceptible de ser absorbido a la circulación sistémica.

El medio receptor elegido, es un factor crítico, ya que tiene que cumplir la condiciones sink anteriormente descritas y efectivamente tiene que ser un solvente compatible con los tejidos. Por ese motivo se escogió el Transcutol[®] ya que posee ambas características. La solubilidad de la nistatina en Transcutol[®] fue $1.89\ \text{mg/mL}$. Antes de realizar el experimento propiamente dicho se determinó la integridad de la barrera mediante la medición de la pérdida de agua transepitelial (TEWL) (Nangia y cols. 1999). Aquellas células que con un valor de TEWL por encima de $10\ \text{g}\ (\text{h}\ \text{m}^2)^{-1}$ fueron descartados. El TEWL es definido como la medida de la cantidad de agua que pasa desde el interior del organismo hacia la atmósfera a través de la piel, mediante los mecanismo de difusión y evaporación (van der Valk y cols. 2005). Ya que una de la funciones de la piel es precisamente impedir la pérdida del agua del interior del organismo, la medición del TEWL es un reflejo de la funcionalidad de la piel como barrera de protección.

Tras la cuantificación de las cantidades permeada acumuladas en la piel se observó que la nistatina contenida en la nanoemulsión no era capaz de atravesar la piel hasta las 24h desde que se inicia el experimento. Desde este punto y hasta el final de la experiencia (27h) las cantidades permeadas fueron muy bajas y prácticamente constantes en todos los replicados del experimento. Por este motivo no se pudo calcular el flujo transdérmico ni ningún otro parámetro (K_p , T_{lag} , etc.)

Para la determinación de la cantidad de nistatina retenida en la piel se ensayaron varios medios extractivos, de los cuales una solución de acetonitrilo:agua (80:20 v/v) fue seleccionada. Esta es la solución que consiguió extraer una mayor cantidad de nistatina

de la piel (9.5%). Para ello la piel procedente de los estudios de permeación se incubaba con esta mezcla extractiva y el sobrenadante es analizado mediante HPLC. De esta forma se determinó que la cantidad de nistatina retenida en el tejido tras 27h de aplicación de nanoemulsión fue 617.46 µg/g tejido. Este valor representa el 37.57% de la dosis administrada en el compartimento donador.

5.6. Ensayo de permeación en mucosa oral porcina.

Cuando no puede disponerse de mucosa oral humana, la mucosa oral de cerdo es una buena alternativa debido a la similitud histológica y bioquímica con la humana (deVries y cols. 1991; Wertz y Squier, 1991; Xiang y cols. 2002; Diaz-del Consuelo y cols. 2005). Además la permeabilidad de la mucosa de cerdo también ha resultado ser similar a la humana (Lesch y cols. 1989). La mucosa oral se obtuvo de cerdos (tanto macho como hembra) de entre 3 y 4 meses. El estudio estuvo aprobado por el comité ético de la Universidad de Barcelona. Estos animales fueron sacrificados con una sobredosis de tiopental sódico. En ese momento la mucosa oral de la mejilla del cerdo fue extraída y dispuesta en un contenedor con solución de Hanks y fue trasladada al laboratorio en la menor brevedad posible.

La viabilidad de la mucosa oral una vez ha sido extraída del animal sacrificado, ha sido estudiada anteriormente (Figueiras y cols. 2009; Nicolazzo y cols. 2003; Imbert y Cullander, 1999). Por ejemplo Imbert et al (1999) demostró que no había reducción de viabilidad celular tras 20 horas de almacenamiento en tampón Ringer bicarbonato de Krebs. La composición de este tampón (KCl=0.34; NaH₂PO₄=0.18; MgCl₂=0.0468; NaCl=7.0; Na₂HPO₄=0.1; Glucosa=1.8, g/L) es muy parecida a la de la solución de Hanks empleada (CaCl₂=0.14; KCl=0.14; KH₂PO₄=0.06; MgSO₄=0.1; MgCl₂=0.1; NaCl=8.0; NaHCO₃=0.35; Na₂HPO₄=0.09; Glucosa=1, g/L). El protocolo de almacenamiento que hemos llevado a cabo sigue las recomendaciones de estos autores. En los experimentos realizados con mucosa oral, es importante mantener la viabilidad celular del tejido, ya que esta es una de las barreras de difusión del fármaco, a parte de los lípidos intercelulares, como ya se comentó anteriormente.

Una vez que la mucosa llega al laboratorio esta es cortada con un espesor de 500 µm, que corresponde con el espesor del epitelio bucal (Sudhakar y cols. 2006).

De la misma forma que el experimento de permeación con piel, el medio receptor en el experimento de permeación en mucosa fue Transcutol[®], un solvente biocompatible, que permitió cumplir con las condiciones sink a lo largo del experimento.

5. DISCUSIÓN

Tras la cuantificación de las cantidades de nistatina permeadas acumuladas a lo largo del tiempo, no se encontró nistatina en el medio receptor hasta el final del experimento (6h), punto en el que se encontró una concentración muy baja de nistatina (mediana: 5.57 μ g). Así que de forma similar al experimento de permeación transdérmica, no se pudo calcular el flujo transdérmico de entrada, así como ningún otro parámetro de permeación.

Para la cuantificación de nistatina retenida en el tejido, se utilizó la solución de acetonitrilo:agua (80:20). Esta solución consiguió extraer el 45.12% de nistatina en la mucosa oral. La cantidad de nistatina retenida en la mucosa después de 6 horas fue 244.88 μ g/g de tejido. Esto representa el 48.97% de la dosis inicial sembrada en el compartimento donador.

Tanto en el caso de la permeación en piel como en mucosa, las concentraciones permeadas, únicamente se encontraron al final del experimento y fueron concentraciones bajas, y prácticamente constantes en el caso de la piel. Con estos resultados podemos predecir que no se obtendrá un efecto sistémico de la nistatina, y dada que esta es tóxica tras su administración intravenosa (Johnson y cols. 1998), podría considerarse la potencial aplicación clínica de las formulaciones para el tratamiento de candidiasis asociado a piel y mucosas. Precisamente debido a su toxicidad existen relativamente pocos estudios farmacocinéticos que estudien el comportamiento de la nistatina tras su administración intravenosa. Uno de estos estudios fue realizado con nistatina liposomal en conejo. Groll y cols. (2000), asegura que los datos farmacocinéticos en conejo son parecidos al los humanos y por tanto pueden ser utilizados para realiza inferencias sobre el comportamiento en humanos.

Basándonos en las concentraciones máximas (C_{max}) encontradas en este estudio, después de una administración a dosis repetidas durante 14 días; $C_{max} = 12.86\mu$ g/mL (dosis: 2mg/kg) y 50.40 μ g/mL (dosis: 6mg/kg) y basándonos en la ecuación 10, descrita en la introducción, que predice la concentración plasmática en estado estacionario y en el aclaramiento plasmático de la nistatina tras su administración intravenosa 0.168L kg/h (dosis 2mg/kg) y 0.071 L kg/h (dosis 6mg/kg), el flujo requerido para obtener concentraciones terapéuticas sería de 1620.36 μ g h/cm² (dosis 2mg/kg) y 2683.8 μ g h/cm² (dosis 6mg/kg) para una persona de unos 75 kg de peso corporal. Para este cálculo se ha tenido en cuenta que el área de aplicación en la boca correspondería con el área total de la misma, estimado en 100 cm² por Patel y cols.

(2011). En el caso de la permeación en mucosa nos encontramos un único valor de cantidad de nistatina, al último tiempo experimental, por lo que el flujo no puede ser calculado. En el caso de la permeación en piel se obtiene el mismo resultado. Se ha considerado que no se puede estimar un flujo debido a que probablemente los datos obtenidos no se encuentren en estado estacionario. De todas formas, y únicamente a modo de ejemplo, si se realizara una recta de regresión con los tres valores de cantidad obtenidos el flujo transdérmico que se obtendría sería de $0.02 \mu\text{g h/cm}^2$, que como se ha comentado está lejos del flujo necesario para alcanzar concentraciones plasmáticas de nistatina. Por esto podríamos considerar el empleo de nanoemulsiones de nistatina como un tratamiento de candidiasis muco-cutáneas seguro y de baja incidencia de efectos adversos sistémicos.

Respecto a la cuantificación de las cantidades retenidas en piel y mucosa, en nuestra opinión consideramos que estos datos podrán ser correlacionados con los datos obtenidos de la eficacia antimicrobiológica *in vitro* para poder predecir la eficacia del tratamiento. Otros autores, en el caso del tratamiento de candidiasis en la mucosa oral, correlacionan las cantidades de nistatina encontrada en saliva con la eficacia del tratamiento (Aksungur y cols. 2004; Llabot y cols. 2009). No obstante, nosotros pensamos que no es una aproximación que pueda predecir adecuadamente la eficacia del tratamiento. Por eso nos planteamos la posibilidad de establecer una relación entre la eficacia del tratamiento con el fármaco retenido en el tejido.

La MIC obtenida en *Candida albicans* en el estudio de eficacia antimicrobiológica *in vitro*, para el tratamiento con la fórmula N1 y N2 es de $0.78 \mu\text{g/mL}$, en ambos casos. La cantidad de nistatina retenida en la piel tras 27h de tratamiento con la fórmula N1 fue de $617.46 \mu\text{g/g}$ tejido y en el caso del tratamiento de la mucosa oral con la fórmula N2 fue de $244.88 \mu\text{g/g}$ de tejido. Estas cantidades son más que suficiente para obtener un prolongado efecto antimicrobiológico. La cantidad de nistatina retenida en el tejido representa aproximadamente 790 y 300 veces más la MIC, respectivamente. Gunderson y cols. (2000), describió el mecanismo de acción de la nistatina como concentración-dependiente. De tal forma que de 0.5 a 2 veces el valor de la MIC, se obtiene un efecto fungistático. En cambio de 2 a 4 veces la MIC se obtiene una rápida actividad fungicida. Este autor también señala que el PAFE o efecto post-antifúngico (definido como la supresión del crecimiento fúngico tras una exposición limitada al fármaco), se produce

5. DISCUSIÓN

durante un tiempo medio de entre 3.1 a 6.3h (según la especie de *Candida*), tras una exposición a 0.25 a 1 vez la MIC durante 30 minutos.

Así pues podemos concluir, en base a los estudio *in vitro* que el tratamiento de nistatina con las formulaciones N1 y N2 poseerá una acción fungistática, fungicida y un prolongado efecto PAFE.

Por otro lado la mayor proporción de fármaco retenido en la mucosa, en relación con el encontrado en la piel (48.97% en la formulación N2 frente al 37.57% en la formulación N1), se explica por la mayor permeabilidad de la mucosa con respecto a la piel. Hay que tener en cuenta además, que el Transcutol[®] es un promotor de la permeación, por lo que también puede sumarse este efecto al anterior.

Como se puede desprender de los estudio de permeación realizados, la mucosa oral es mucho mas permeable que la piel, como otros autores demostraron previamente (Galey y cols. 1976). A pesar de que el 25% de la mucosa oral se encuentra queratinizado (mucosa masticatoria, paladar duro y encías), hay una falta de un estrato corneo real (Patel y cols. 2011), lo que la hace más permeable que la piel. A pesar de ello, la mucosa sigue siendo una barrera para la difusión del fármaco, como se ha observado en este estudio. La permeabilidad de la barrera, en la mucosa no queratinizada, la constituyen por un lado el propio epitelio y por otro los lípidos intercelulares. La nistatina debido a sus propiedades anfífilas se reparte entre los dominios hidrófilos y lipófilos. Así la superficie del epitelio captaría nistatina relativamente rápido y una vez saturada, esta capa no podría retener más fármaco, a pesar del tiempo de exposición del tejido. Así la nistatina empieza a difundir hacia capas mas internas del tejido a velocidad constante, que es mas dependiente de la capacidad de reservorio de la capa superficial, que del tiempo de exposición del fármaco (Squier y Kremer, 2001). Este hecho combinado con el elevado peso molecular de la nistatina, hace difícil que esta sea capaz de atravesar la piel y la mucosa. Otro factor que se tiene que tener en cuenta en el caso de la formulacion N2 en su aplicación en la mucosa, es su composición. Esta tiene un 15.42% de Transcutol[®]. Este excipiente parece tener una función depot, que incrementa la retención del fármaco en la piel (Muraa y cols. 2000; Godwin y cols. 2002). Este efecto depot también puede observarse en la mucosa oral.

Por último vale la pena comparar los resultados obtenidos en el estudio de liberación y en el estudio de permeación. En los estudios de liberación, se ha observado que en ambos casos, la liberación de la nistatina de las nanoemulsiones N1 y N2 se produce de forma lenta en el tiempo. Pero el fármaco liberado a cada tiempo experimental no se relaciona directamente con la cantidad permeada a cada tiempo. En el caso de la formulación N1 se liberó aproximadamente el 25% de la nistatina al cabo de 27h (apartado 4.4), pero se obtuvo una cantidad retenida en la piel de 617.46 $\mu\text{g/g}$ tejido que equivale a un 37.57% de la dosis aplicada. En el caso de la N2 al cabo de 6h se liberó aproximadamente el 6% del fármaco (apartado 4.4), en cambio al cabo de 6h la cantidad de fármaco encontrado en el tejido fue de 244.88 $\mu\text{g/g}$ de tejido, que representa el 50% de la dosis aplicada. Esta divergencia en los resultados se debe a que en los estudios de liberación *in vitro* no se puede apreciar el efecto promotor del vehículo, en cambio este sí se puede apreciar en los experimentos de permeación *ex vivo*.

5.7. Estudio de la ultraestructura de la mucosa oral tras el tratamiento con N2.

Primero de todo, puntualizar que estos estudios no se han realizado sobre la piel tratada con N1 ya que existen numerosas publicaciones que demuestran el uso seguro de las nanoemulsiones cutáneas (Shakeel y cols. 2010). Sin embargo, no se han encontrado estudios que evalúen el efecto de las nanoemulsiones sobre la mucosa oral. Así pues, se realizó un estudio de la ultraestructura del tejido, con el fin de observar si el tratamiento con la nanoemulsión podría tener algún efecto sobre la microestructura bucal.

Para ello las mucosas procedentes del estudio de permeación con la nanoemulsión N2 se estudiaron mediante TEM. Como control se utilizaron mucosas que estuvieron en la celda de Franz durante el mismo tiempo que las muestras, y por tanto en contacto con Transcutol[®] como medio receptor y con solución de Hanks en el compartimento donador. Tras el experimento las mucosas fueron cortadas y sus bordes fijados con glutaraldehído al 5%. Posteriormente se fijó el tejido con tetróxido de rutenio al 0.2%. El rutenio es un buen fijador que revela la existencia de compuestos celulares no revelados con el tetróxido de osmio, debido a su mayor reactividad. Por tanto, el tetróxido de rutenio se ha utilizado para visualizar los lípidos saturados extracelulares (Vanden y cols. 1997). Ambos productos, rutenio y osmio, oxidan los lípidos, por lo que también permiten ver las membranas celulares. A continuación se procede a la criosustitución con metanol, tetróxido de osmio y acetato de uranilo. Este procedimiento se

5. DISCUSIÓN

utilizó para deshidratar el tejido y aumentar el contraste de la preparación. Finalmente el metanol fue sustituido por una resina (Epon) que una vez polimerizada permite ser cortada y observada en el microscopio.

Las imágenes de la muestra control (Figura 8, artículo 2) no muestra un ensanchamiento de los espacios intercelulares, ni vesículas citoplasmáticas. Este hecho es similar a los descritos en estudios previos que comparaban la mucosa sana y dañada (Guedes y cols. 2002). En las imágenes también se observan estructuras lamelares similares a las encontradas al estudiar los lípidos del estrato corneo (Barbosa-Barros y cols. 2009). También se perciben células granulares que contienen glucógeno y gránulos membranosos.

En las imágenes de la mucosa tratada con la nanoemulsión N2 (Figura 9, artículo 2) encontramos células granulares de forma similar a las muestras control. Se pueden observar orgánulos membranosos, monofilamentos en el citoplasma y desmosomas y lípidos intercelulares en forma de material electro-denso. No se observa ensanchamiento de los espacios intercelulares, ni vesículas citoplasmáticas, como en el caso de las muestras control. Así pues, no se observan diferencias en la integridad de la microestructura entre las muestra control y la tratada.

De esta forma podemos afirmar que la nanoemulsión no tendrá un efecto dañino sobre la microestructura y que podría ser utilizada para el tratamiento de candidiasis de la mucosa oral, más si cabe, cuando esta está asociada a mucositis.

Además la fórmula aquí estudiada también podría ser tragada para tratar candidiasis esofágicas y gastrointestinales, las cuales son una complicación común de la candidiasis oral.

NANOEMULSIONES DE NISTATINA PARA
APLICACIÓN EN CANDIDIASIS MUCO-
CUTANEAS

CAPÍTULO 6. CONCLUSIONES

1. Se han obtenido dos nanoemulsiones de Nistatina: N1 para su aplicación cutánea y N2 para su aplicación sobre la mucosa oral. La fase oleosa seleccionada para su preparación y que permitió solubilizar concentraciones máximas de Nistatina fue el Labrafac lipophile[®]. Ambas nanoemulsiones son vehículos adecuados para la formulación de nistatina a una dosis de 0.4% p/p.
2. Tras su caracterización mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM), se aprecia una morfología regular y bien definida, así como, una distribución y tamaño medio de gota muy reducidos, concretamente de 75 nm y 138 nm, para N1 y N2, respectivamente. Los datos en esta fase de la investigación confirmaron la obtención de nanoemulsiones W/O. Todas estas características se mantienen a lo largo del periodo de estudio.
3. El empleo de ultrasonidos para la obtención de los sistemas nanoemulsionados revela la influencia del tiempo de sonicación. De modo que una sonicación superior a 5 minutos muestra la formación de aglomerados.
4. Las formulaciones obtenidas se presentan como fluidos newtonianos con una baja viscosidad (menor a 100 mPa s) lo que les permite ser administradas en forma de roll-on, enjuagues y/o spray en función de la zona y extensión de la patología a tratar.
5. En base a los resultados aportados en la caracterización fisico-química a lo largo de 30 días y mediante los ensayos de estabilidad a largo plazo, se aprecia que ambos sistemas son estables en el tiempo.
6. Se ha validado un método de HPLC, rápido, lineal, exacto y preciso que permite cuantificar tanto la nistatina incorporada en la nanoemulsión, como la liberada y permeada en los estudios *in vitro*.
7. Los perfiles de liberación de la nistatina de las nanoemulsiones siguen una cinética de orden uno, con una lenta constante de liberación, permitiendo la liberación prolongada del fármaco.

6. CONCLUSIONES

8. De los estudios de eficacia antifúngica *in vitro* se puede afirmar que la incorporación de nistatina a las nanoemulsiones aumenta su eficacia en comparación con el fármaco libre.
9. Los estudios de permeación *ex vivo* en piel cutánea humana y mucosa bucal porcina revelan cantidades de nistatina permeadas prácticamente nulas, preservando, por tanto, de la aparición de efectos sistémicos, tras la aplicación del polieno.
10. Las cantidades retenidas de nistatina tanto en la piel, como en la mucosa oral, son muy superiores a la Concentración Mínima Inhibitoria (MIC), asegurando un efecto fungicida, fungistático y un prolongado efecto post-antifúngico (PAFE).
11. Tras estudiar la ultra-estructura de la mucosa bucal tratada con la nanoemulsión N2 se comprueba la inocuidad de la formulación, lo que la convierte en potencial vehículo para su aplicación clínica en candidiasis asociadas a mucositis.

NANOEMULSIONES DE NISTATINA PARA
APLICACIÓN EN CANDIDIASIS MUCO-
CUTANEAS

CAPÍTULO 7. BIBLIOGRAFÍA

Abu-Elteen KH. Incidence and distribution of *Candida* species isolated from human skin in Jordan. *Mycoses* 1999;42(4):311-317.

Acosta E. Bioavailability of nanoparticles in nutrient and nutraceutical delivery. *Current Opinion in Colloid and Interface Science* 2009;14(1):3-15.

Akins RA. An update on antifungal targets and mechanisms of resistance in *Candida albicans*. *Med Mycol* 2005;43(4):285-318.

Aksungur P, Sungur A, Unal S, Iskit AB, Squier CA, Senel S. Chitosan delivery systems for the treatment of oral mucositis: in vitro and in vivo studies. *J Control Release* 2004;98(2):269-279.

Al-Khamis K, Davis SS, Hadgraft J. Microviscosity and drug release from topical. Gel formulations. *Pharmaceutical Research* 1986;3(4):214-217.

Allan G. Azone®. In: Smith EW, Maibach HI, editors. *Percutaneous Penetration Enhancers* FL. USA: CRC Press, Boca Raton; 1995.

Almirante B, Rodriguez D, Park BJ, Cuenca-Estrella M, Planes AM, Almela M, et al. Epidemiology and predictors of mortality in cases of *Candida* bloodstream infection: results from population-based surveillance, barcelona, Spain, from 2002 to 2003. *J Clin Microbiol* 2005;43(4):1829-1835.

Alsarra IA, Alanazi FK, Mahrous GM, Abdel Rahman AA, Al Hezaimi KA. Clinical evaluation of novel buccoadhesive film containing ketorolac in dental and post-oral surgery pain management. *Pharmazie* 2007;62(10):773-778.

Alur HH, Johnston TP, Mitra AK. *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology*. New York: Marcel Dekker Inc; 2001.

Anigbogu ANC, Williams AC, Barry BW, Edwards HGM. Fourier transform Raman spectroscopy of interactions between the penetration enhancer dimethyl sulfoxide and human stratum corneum. *International Journal Pharmaceutics* 1995;125:265-282.

Araujo FA, Kelmann RG, Araujo BV, Finatto RB, Teixeira HF, Koester LS. Development and characterization of parenteral nanoemulsions containing thalidomide. *Eur J Pharm Sci* 2011;42(3):238-245.

Arikan S, Rex JH. Nystatin LF (Aronex/Abbott). *Curr Opin Investig Drugs* 2001;2(4):488-495.

Ashton P, Walters KA, Brain KR, Hadgraft J. Surfactant effects in percutaneous absorption: II. Effects on protein and lipid structure of stratum corneum *International Journal Pharmaceutics* 1992;87:265-269.

7. BIBLIOGRAFÍA

Aungst BJ. Fatty acid as skin permeation enhancers. In: Smith EW, Maibach HI, editors. *Percutaneous Penetration Enhancers* FL: CRC Press, Boca Raton; 1995. p. 277.

Aungst BJ, Blake JA, Rogers NJ, Hussain MA. Transdermal oxymorphone formulation development and methods for evaluating flux and lag times for two skin permeation-enhancing vehicles. *J Pharm Sci* 1990;79(12):1072-1076.

Baboota S, Shakeel F, Ahuja A, Ali J, Shafiq S. Design, development and evaluation of novel nanoemulsion formulations for transdermal potential of celecoxib. *Acta Pharm* 2007;57(3):315-332.

Badiee P, Alborzi A, Davarpanah MA, Shakiba E. Distributions and antifungal susceptibility of *Candida* species from mucosal sites in HIV positive patients. *Arch Iran Med* 2010;13(4):282-287.

Balachandran S, Kentish SE, Mawson R, Ashokkumar M. Ultrasonic enhancement of the supercritical extraction from ginger. *Ultrason Sonochem* 2006;13(6):471-479.

Barbosa-Barros L, Barba C, Rodriguez G, Cocera M, Coderch L, Lopez-Iglesias C, et al. Lipid nanostructures: self-assembly and effect on skin properties. *Mol Pharm* 2009;6(4):1237-1245.

Barret JP, Ramzy PI, Hegggers JP, Villareal C, Herndon DN, Desai MH. Topical nystatin powder in severe burns: a new treatment for angioinvasive fungal infections refractory to other topical and systemic agents. *Burns* 1999;25:505-508.

Barry BW. Drug delivery routes in skin: a novel approach. *Advanced Drug Delivery Reviews* 2002;54(suppl.1):S31-S40.

Barry BW. Lipid-Protein-Partitioning theory of skin penetration enhancement . *Journal of controlled release* 1991;15(3):237-248.

Barry BW. Action of skin penetration enhancers-the Lipid Protein Partitioning theory. *Int J Cosmet Sci* 1988;10(6):281-293.

Barry BW. Mode of action of penetration enhancers in human skin. *Journal of controlled release* 1987;6:85-97.

Barry BW. Methods for studying percutaneous absorption In: Barry BW, editor. *Dermatological formulation* New York: Marcel Dekker; 1983. p. 234-295.

Beastall JC, Hadgraft J, Washington C. Mechanism of action of Azone as a percutaneous penetration enhancer: Lipid bilayer fluidity and transition temperature effects. *International journal of pharmaceutics* 1988;43(3):207-213.

Beikert FC, Le MT, Koeninger A, Technau K, Clad A. Recurrent vulvovaginal candidosis: focus on the vulva. *Mycoses* 2011;54(6):e807-10.

Bendel CM. Colonization and epithelial adhesion in the pathogenesis of neonatal candidiasis. *Semin Perinatol* 2003;27(5):357-364.

Berner B, Juang RH, Mazzenga GC. Ethanol and water sorption into stratum corneum and model systems. *J Pharm Sci* 1989;78(6):472-476.

Bhatia KS, Singh J. Percutaneous absorption of LHRH through porcine skin: effect of N-methyl 2-pyrrolidone and isopropyl myristate. *Drug development and industrial pharmacy* 1997;23:1111-1114.

Bivas-Benita M, Oudshoorn M, Romeijn S, van Meijgaarden K, Koerten H, van der Meulen H, et al. Cationic submicron emulsions for pulmonary DNA immunization. *J Control Release* 2004;100(1):145-155.

Bonina FP, Montenegro L, Micali G, West DP, Palicharla P, Koch RL. In vitro percutaneous absorption evaluation of phenobarbital through hairless mouse, adult and premature human skin. *International journal of pharmaceutics* 1993;98(1-3):93-99.

Bouwstra JA, de Vries MA, Gooris GS, Bras W, Brussee J, Ponc M. Thermodynamic and structural aspects of the skin barrier. *Journal of controlled release* 1991;15:209-220.

Brito GN, Inocencio AC, Querido SM, Jorge AO, Koga-Ito CY. In vitro antifungal susceptibility of *Candida* spp. oral isolates from HIV-positive patients and control individuals. *Braz Oral Res* 2011;25(1):28-33.

Burkman RT. The transdermal contraceptive patch: a new approach to hormonal contraception. *International Journal of Fertility and Women's Medicine* 2002;47(2):69-76.

Butler C. Fungal sex and pathogenesis. *Clinical Microbiology Reviews* 2010;23(1):140-159.

Calderone RA, Fonzi WA. Virulence factors of *Candida albicans*. *Trends in Microbiology* 2001;9(7):327-335.

Cannon RD, Chaffin WL. Oral colonization by *Candida albicans*. *Critical reviews in oral biology and medicine* 1999;10(3):359-383.

Carelli V, Di Colo G, Nannipieri E, Serafini MF. Enhancement effects in the permeation of alprazolam through hairless mouse skin. *International journal of pharmaceutics* 1992;88:89-97.

7. BIBLIOGRAFÍA

Celia C, Trapasso E, Cosco D, Paolino D, Fresta M. Turbiscan lab expert analysis of the stability of ethosomes and ultradeformable liposomes containing a bilayer fluidizing agent. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2009;72(1):155-160.

Cevc G, Blume G, Schätzlein A, Gebauer D, Paul A. The skin: a pathway for systemic treatment with patches and lipid-based agent carriers. *Advanced Drug Delivery Reviews* 1996;18(3):349-378.

Challacombe SJ, Rahman D, O'Hagan DT. Salivary, gut, vaginal and nasal antibody responses after oral immunization with biodegradable microparticles. *Vaccine* 1997;15(2):169-175.

Chen SC, Sorrell TC. Antifungal agents. *Medical Journal of Australia* 2007;187(7):404-409.

Choi MJ, Maibach HI. Liposomes and niosomes as topical drug delivery systems. *Skin Pharmacol Physiol* 2005;18(5):209-219.

Clares B, Gallardo V, Medina MM, Ruiz MA. Multilamellar liposomes of triamcinolone acetonide: preparation, stability, and characterization. *J Liposome Res* 2009;19(3):197-206.

Cousido MC, Tomas Carmona I, Garcia-Caballero L, Limeres J, Alvarez M, Diz P. In vivo substantivity of 0.12% and 0.2% chlorhexidine mouthrinses on salivary bacteria. *Clin Oral Investig* 2010;14(4):397-402.

Croy SR, Kwon GS. The effects of Pluronic block copolymers on the aggregation state of nystatin. *J Control Release* 2004;95(2):161-171.

Date AA, Nagarsenker MS. Design and evaluation of self-nanoemulsifying drug delivery systems (SNEDDS) for cefpodoxime proxetil. *Int J Pharm* 2007;329(1-2):166-172.

Davies AN, Brailsford SR, Beighton D. Oral candidosis in patients with advanced cancer. *Oral Oncol* 2006;42(7):698-702.

de Aguiar MM, de Albuquerque RP, Marinho DS, Braga BR, Dornelas CB, Oliveira A, et al. Oral sustained release nystatin tablets for the treatment of oral candidiasis: formulation development and validation of UV spectrophotometric analytical methodology for content determination. *Drug Dev Ind Pharm* 2010;36(5):594-600.

de Vries ME, Bodde HE, Verhoef JC, Junginger HE. Developments in buccal drug delivery. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst* 1991;8(3):271-303.

Devarajan V, Ravichandran V. Nanoemulsions: as modified drug delivery tool *Pharmacie Globale (IJCP)* 2011;4(01).

Diaz-Del Consuelo I, Jacques Y, Pizzolato GP, Guy RH, Falson F. Comparison of the lipid composition of porcine buccal and esophageal permeability barriers. *Arch Oral Biol* 2005;50(12):981-987.

Diez-Sales O, Watkinson AC, Herraéz-Dominguez M, Javaloyes C, Hadgraft J. A mechanistic investigation of the in vitro human skin permeation enhancing effect of Azone®. *International journal of pharmaceutics* 1996;129(1):33-40.

Djordjevic L, Primorac M, Stupar M, Krajisnik D. Characterization of caprylocaproyl macrogolglycerides based microemulsion drug delivery vehicles for an amphiphilic drug. *Int J Pharm* 2004;271(1-2):11-19.

du Plessis J, Pugh WJ, Judefeind A, Hadgraft J. Physico-chemical determinants of dermal drug delivery: effects of the number and substitution pattern of polar groups. *Eur J Pharm Sci* 2002;16(3):107-112.

Dubey V, Mishra D, Asthana A, Jain NK. Transdermal delivery of a pineal hormone: melatonin via elastic liposomes. *biomaterials* 2006;27(18):3191-3496.

Dubey V, Mishra D, Nahar M, Jain V, Jain NK. Enhanced transdermal delivery of an anti-HIV agent via ethanolic liposomes. *Nanomedicine* 2010;6(4):590-596.

Elia J, Wilson Z, La Porta LS, Algon SA, Prowler ML, Cartwright ST, et al. Methylphenidate transdermal system: clinical applications for attention-deficit/hyperactivity disorder. *Expert Rev Clin Pharmacol* 2011;4(3):311-328.

Elias PM. Epidermal lipids, barrier function, and desquamation. *J Invest Dermatol* 1983;80 Suppl:44s-49s.

Elias PM, Cooper ER, Korc A, Brown BE. Percutaneous transport in relation to stratum corneum structure and lipid composition. *J Invest Dermatol* 1981;76(4):297-301.

Ellepola AN, Panagoda GJ, Samaranayake LP. Adhesion of oral *Candida* species to human buccal epithelial cells following brief exposure to nystatin. *Oral Microbiol Immunol* **1999a**;14(6):358-363.

Ellepola AN, Samaranayake LP. Oral candidal infections and antimycotics. *Crit Rev Oral Biol Med* 2000;11(2):172-198.

Ellepola AN, Samaranayake LP. The in vitro post-antifungal effect of nystatin on *Candida* species of oral origin. *J Oral Pathol Med* **1999b**;28(3):112-116.

Ellepola AN, Samaranayake LP. The postantifungal effect (PAFE) of antimycotics on oral *C. albicans* isolates and its impact on candidal adhesion. *Oral Dis* **1998b**;4(4):260-267.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Ellepola AN, Samaranayake LP. Adhesion of oral *Candida albicans* isolates to denture acrylic following limited exposure to antifungal agents. *Arch Oral Biol* **1998a**;43(12):999-1007.
- El-Ridy MS, Abdelbary A, Essam T, El-Salam RM, Kassem AA. Niosomes as a potential drug delivery system for increasing the efficacy and safety of nystatin. *Drug development and industrial pharmacy* 2011;37(12):1491-1508.
- Elsner P. Anatomical and physiological basis of topical therapy of the mucosa. *Curr Probl Dermatol* 2011;40:1-8.
- Erjavec V, Pavlica Z, Sentjurc M, Petelin M. In vivo study of liposomes as drug carriers to oral mucosa using EPR oximetry. *Int J Pharm* 2006;307(1):1-8.
- Eros Y, Thaleb A. Rheological studies of creams. *Acta Pharm. Hung* 1994; 101-103.
- European Medicine Agency (EMA). Guideline on validation of bioanalytical methods. 2009;EMA/CHMP/EWP/192217.
- European Pharmacopoeia. Vo.1. 6.0. Council of Europe, Strasbourg. 2008.
- Evans EC, Gray M. What interventions are effective for the prevention and treatment of cutaneous candidiasis? *J Wound Ostomy Continence Nurs* 2003;30(1):11-16.
- Falagas ME, Betsi GI, Athanasiou S. Probiotics for prevention of recurrent vulvovaginal candidiasis: a review. *J Antimicrob Chemother* 2006;58(2):266-272.
- Feldmann RJ, Maibach HI. Penetration of 14c Hydrocortisone through Normal Skin: the Effect of Stripping and Occlusion. *Arch Dermatol* 1965;91:661-666.
- Ferrer J. Vaginal candidosis: epidemiological and etiological factors. *Int J Gynaecol Obstet* 2000;71 Suppl 1:S21-7.
- Figueiras A, Hombach J, Veiga F, Bernkop-Schnürch A. In vitro evaluation of natural and methylated cyclodextrins as buccal permeation enhancing system for omeprazole delivery. *Eur J Pharm Biopharm* 2009;71(2):339-345.
- Firinu D, Massidda O, Lorrai MM, Serusi L, Peralta M, Barca MP, et al. Successful treatment of chronic mucocutaneous candidiasis caused by azole-resistant *Candida albicans* with posaconazole. *Clin Dev Immunol* 2011;2011:283239.
- França EJ, Andrade CG, Furlaneto-Maia L, Serpa R, Oliveira MT, Quesada RM, et al. Ultrastructural architecture of colonies of different morphologies produced by phenotypic switching of a clinical strain of *Candida tropicalis* and biofilm formation by variant phenotypes. *Micron* 2011;42(7):726-732.

Fu Y, Kao WJ. Drug release kinetics and transport mechanisms of nondegradable and degradable polymeric delivery systems. *expert opinion on* 2010;7:429-444.

Fuhrman Jr LC, Michniak BB, Behl CR, Malick AW. Effect of novel penetration enhancers on the transdermal delivery of hydrocortisone: an in vitro species comparison. *Journal of controlled release* 1997;45:199-206.

Galer BS, Gammaitoni AR, Oleka N, Jensen MP, Argoff CE. Use of the lidocaine patch 5% in reducing intensity of various pain qualities reported by patients with low-back pain. *Curr Med Res Opin* 2004;20 Suppl 2:S5-12.

Galey WR, Lonsdale HK, Nacht S. The in vitro permeability of skin and buccal mucosa to selected drugs and tritiated water. *J Invest Dermatol* 1976;67(6):713-717.

Ganta S, Deshpande D, Korde A, Amiji MM. A review of multifunctional nanoemulsion systems to overcome oral and CNS drug delivery barriers. *Mol Membr Biol* 2010;27(7):260-273.

Gao S, Singh J. Mechanism of transdermal transport of 5-fluorouracil by terpenes: carvone, 1,8-cineole and thymol. *International journal of pharmaceutics* 1999;154(1):67-77.

Gligorov J, Bastit L, Gervais H, Henni M, Kahila W, Lepille D, et al. Prevalence and treatment management of oropharyngeal candidiasis in cancer patients: results of the French CANDIDOSCOPE study. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2011;80(2):532-539.

Godwin DA, Kim NH, Felton LA. Influence of Transcutol CG on the skin accumulation and transdermal permeation of ultraviolet absorbers. *Eur J Pharm Biopharm* 2002;53(1):23-27.

Goebel C, Hewitt NJ, Kunze G, Wenker M, Hein DW, Beck H, et al. Skin metabolism of aminophenols: human keratinocytes as a suitable in vitro model to qualitatively predict the dermal transformation of 4-amino-2-hydroxytoluene in vivo. *Toxicol Appl Pharmacol* 2009;235(1):114-123.

Gonzalez-Mira E, Nikolic S, Garcia ML, Egea MA, Souto EB, Calpena AC. Potential use of nanostructured lipid carriers for topical delivery of flurbiprofen. *J Pharm Sci* 2011;100(1):242-251.

Goodman M, Barry BW. Action of penetration enhancers on human stratum corneum as assessed by differential scanning calorimetry. In: Bronaugh RL, Maibach HI, editors. *Percutaneous absorption Mechanisms-Methodology-Drug Delivery* New York: Marcel Dekker; 1989. p. 567-593.

7. BIBLIOGRAFÍA

Goodman R, Barry BW. Action of skin permeation enhancers azone, oleic acid and decylmethyl sulphoxide. Permeation and DSC studies. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 1986;38:71-79.

Gore AV, Chien YW. The nicotine transdermal system. *Clin Dermatol* 1998;16(5):599-615.

Gow NA, van de Veerdonk FL, Brown AJ, Netea MG. *Candida albicans* morphogenesis and host defence: discriminating invasion from colonization. *Nat Rev Microbiol* 2011 12;10(2):112-122.

Groll AH, Mickiene D, Werner K, Petraitiene R, Petraitis V, Calendario M, et al. Compartmental pharmacokinetics and tissue distribution of multilamellar liposomal nystatin in rabbits. *Antimicrob Agents Chemother* 2000;44(4):950-957.

Guedes AC, Rotta O, Leite HV, Leite VH. Ultrastructural aspects of mucosae in endemic pemphigus foliaceus. *Arch Dermatol* 2002;138(7):949-954.

Guglielmini G. Nanostructured novel carrier for topical application. *Clin Dermatol* 2008;26(4):341-346.

Gunderson SM, Hoffman H, Ernst EJ, Pfaller MA, Klepser ME. In vitro pharmacodynamic characteristics of nystatin including time-kill and postantifungal effect. *Antimicrob Agents Chemother* 2000;44(10):2887-2890.

Haskell RJ, Shifflett JR, Elzinga PA. Particle-sizing technologies for submicron emulsions. In: Benita S, editor. *Submicron emulsions in drug targeting and delivery* London: Harwood academic publishers; 1998. p. 21-98.

Hearnden V, Sankar V, Hull K, Juras DV, Greenberg M, Kerr AR, et al. New developments and opportunities in oral mucosal drug delivery for local and systemic disease. *Advanced Drug Delivery Reviews* 2012;64(1):16-28.

Hombach J, Palmberger TF, Bernkop-Schnürch A. Development and in vitro evaluation of a mucoadhesive vaginal delivery system for nystatin. *Journal of pharmaceutical sciences* 2009;98(2):555-564.

Idson B. Percutaneous absorption. *Journal of pharmaceutical sciences* 1975;64(6):901-924.

Imbert D, Cullander C. Buccal mucosa in vitro experiments. I. Confocal imaging of vital staining and MTT assays for the determination of tissue viability. *J Control Release* 1999;58(1):39-50.

Indu PK, Shilpa K. Topical delivery of antifungal agents. expert opinion on drug delivery 2010;7(11):1303-1327.

Innocenti M, Moscatelli G, Lopez S. Efficacy of gelclair in reducing pain in palliative care patients with oral lesions: preliminary findings from an open pilot study. *J Pain Symptom Manage* 2002;24(5):456-457.

Izquierdo P, Feng J, Esquena J. The influence of surfactant mixing ratio on nanoemulsion formation by the PIT method. *Journal of colloid and interface science* 2005;285:388-394.

Jacobi U, Tassopoulos T, Surber C, Lademann J. Cutaneous distribution and localization of dyes affected by vehicles all with different lipophilicity. *Arch Dermatol Res* 2006;297(7):303-310.

Jadoul A, Hanchard C, Thysman S, Preat V. Quantification and localization of fentanyl and TRH delivered by iontophoresis in the skin. *International journal of pharmaceutics* 1995;120:221-228.

Jayatilake JA. A review of the ultrastructural features of superficial candidiasis. *Mycopathologia* 2011;171(4):235-250.

Jiang R, Benson HA, Cross SE, Roberts MS. In vitro human epidermal and polyethylene membrane penetration and retention of the sunscreen benzophenone-3 from a range of solvents. *Pharm Res* 1998;15(12):1863-1868.

Johnson EM, Ojwang JO, Szekely A, Wallace TL, Warnock DW. Comparison of in vitro antifungal activities of free and liposome-encapsulated nystatin with those of four amphotericin B formulations. *Antimicrob Agents Chemother* 1998;42(6):1412-1416.

Jordà-Marcos R, Alvarez-Lerma F, Jurado M, Palomar M, Nolla-Salas J, León MA, et al. Risk factors for candidaemia in critically ill patients: a prospective surveillance study. *Mycoses* 2007;50(4):302-310.

Junginger, HE. Ointments and creams as colloidal drug delivery systems. In: *Colloidal Drug Delivery Systems* (Kreuter, J., ed.), Marcel Dekker, New York (1994). pp. 1–28.

Kai T, Nakazono M, Kurosaki Y, Nakayama T, Kimura T. Keratinized epithelial transport of beta-blocking agents. III. Evaluation of enhancing effect on percutaneous absorption using model lipid liposomes. *Biol Pharm Bull* 1993;16(8):801-805.

Kammerau B, Zesch A, Schaefer H. Absolute concentrations of dithranol and triacetyl-dithranol in the skin layers after local treatment: in vivo investigations with four different types of pharmaceutical vehicles. *J Invest Dermatol* 1975;64(3):145-149.

Kandimalla K, Kanikkannan N, Andega S, Singh M. Effect of fatty acids on the permeation of melatonin across rat and pig skin in-vitro and on the transepidermal water loss in rats in-vivo. *J Pharm Pharmacol* 1999;51(7):783-790.

7. BIBLIOGRAFÍA

Katta R, Bogle MA, Levy ML. Primary cutaneous opportunistic mold infections in a pediatric population. *Journal of the American Academy of Dermatology* 2005;53(2):213-219.

Kaur IP, Kakkar S. Topical delivery of antifungal agents. expert opinion on drug delivery 2010;7(11):1303-1327.

Kelmann RG, Kuminek G, Teixeira HF, Koester LS. Carbamazepine parenteral nanoemulsions prepared by spontaneous emulsification process. *Int J Pharm* 2007;342(1-2):231-239.

Kim CK, Kim JJ, Chi SC, Schim CK. Effect of fatty acids and urea on the penetration of ketoprofen through rat skin. *International journal of pharmaceutics* 1993;99:109-118.

Kim YH, Ghanem AH, Mahmoud H, Higuchi WI. Short chain alkanols as transport enhancers for lipophilic and polar/ionic permeants in hairless Mechanism(s) of action. *International journal of pharmaceutics* 1992;80:17-31.

Kim MK, Lee CH, Kim DD. Skin permeation of testosterone and its ester derivatives in rats. *J Pharm Pharmacol* 2000;52(4):369-375.

Klang V, Matsko NB, Valenta C, Hofer F. Electron microscopy of nanoemulsions: an essential tool for characterisation and stability assessment. *Micron* 2012;43(2-3):85-103.

Koc M, Aktas E. Prophylactic treatment of mycotic mucositis in radiotherapy of patients with head and neck cancers. *Jpn J Clin Oncol* 2003;33(2):57-60.

Kogan A, Garti N. Microemulsions as transdermal drug delivery vehicles. *Adv Colloid Interface Sci* 2006;123-126:369-385.

Komata Y, Inaoka M, Kaneko A, Fujie T. In vitro percutaneous absorption of thiamine disulfide from a mixture of propylene glycol and fatty acid. *Journal of pharmaceutical sciences* 1992;81(8):744-746.

Kontoyiannis DP, Lewis RE. Antifungal drug resistance of pathogenic fungi. *Lancet* 2002;359(9312):1135-1144.

Koyama Y, Bando H, Yamashita F, Takakura Y, Sezaki H, Hashida M. Comparative analysis of percutaneous absorption enhancement by d-limonene and oleic acid based on a skin diffusion model. *Pharm Res* 1994;11(3):377-383.

Kreilgaard M. Influence of microemulsions on cutaneous drug delivery. *advanced drug delivery reviews* 2002;54 Suppl 1:S77-98.

Kreilgaard M. Dermal pharmacokinetics of microemulsion formulations determined by in vivo microdialysis. *Pharm Res* 2001;18(3):367-373.

Kreye F, Siepmann F, Zimmer A, Willart JF, Descamps M, Siepmann J. Controlled release implants based on cast lipid blends. *Eur J Pharm Sci* 2011;43(1-2):78-83.

Kumar M, Misra A, Babbar AK, Mishra AK, Mishra P, Pathak K. Intranasal nanoemulsion based brain targeting drug delivery system of risperidone. *Int J Pharm* 2008;358(1-2):285-291.

Kumar M, Misra A, Pathak K. Formulation and characterization of nanoemulsion of olanzapine for intranasal delivery. *PDA J Pharm Sci Technol* 2009;63(6):501-511.

Kunta JR, Goskonda VR, Brotherton HO, Khan MA, Reddy IK. Effect of menthol and related terpenes on the percutaneous absorption of propranolol across excised hairless mouse skin. *J Pharm Sci* 1997;86(12):1369-1373.

Lalla RV, Bensadoun RJ. Miconazole mucoadhesive tablet for oropharyngeal candidiasis. *Expert Review of Anti-Infective Therapy* 2011;9(1):13-17.

Lamb DC, Kelly DE, Schunck WH, Shyadehi AZ, Akhtar M, Lowe DJ, et al. The mutation T315A in *Candida albicans* sterol 14 α -demethylase causes reduced enzyme activity and fluconazole resistance through reduced affinity. *J Biol Chem* 1997;272(9):5682-5688.

Lampe MA, Burlingame AL, Whitney J, Williams ML, Brown BE, Roitman E, et al. Human stratum corneum lipids: characterization and regional variations. *J Lipid Res* 1983;24(2):120-130.

Leopold CS, Lippold BC. An attempt to clarify the mechanism of the penetration enhancing effects of lipophilic vehicles with differential scanning calorimetry (DSC). *J Pharm Pharmacol* 1995a;47(4):276-281.

Leopold CS, Lippold BC. Enhancing effects of lipophilic vehicles on skin penetration of methyl nicotinate in vivo. *J Pharm Sci* 1995b;84(2):195-198.

Lesch CA, Squier CA, Cruchley A, Williams DM, Speight P. The permeability of human oral mucosa and skin to water. *J Dent Res* 1989;68(9):1345-1349.

Lippold BC. How to optimize drug penetration through the skin. *Pharm Acta Helv* 1992;67(11):294-300.

Llabot JM, Manzo RH, Allemandi DA. Novel mucoadhesive extended release tablets for treatment of oral candidosis: "in vivo" evaluation of the biopharmaceutical performance. *J Pharm Sci* 2009;98(5):1871-1876.

Llabot JM, Palma SD, Manzo RH, Allemandi DA. Design of novel antifungal mucoadhesive films. Part II. Formulation and in vitro biopharmaceutical evaluation. *Int J Pharm* 2007;336(2):263-268.

7. BIBLIOGRAFÍA

Lo HJ, Kohler JR, DiDomenico B, Loebenberg D, Cacciapuoti A, Fink GR. Nonfilamentous *C. albicans* mutants are avirulent. *Cell* 1997;90(5):939-949.

López-Martínez R. Candidosis, a new challenge. *Clinics in dermatology* 2010;28(2):178-184.

Lu GW, Gao P. Emulsions and Microemulsions for Topical and Transdermal Drug Delivery. In: Kulkarni V, editor. *Handbook of Non-Invasive Drug Delivery Systems*: elsevier; 2010. p. 59-94.

Mac Mod analytical Inc. Comparison Guide to C18 Reversed Phase HPLC Columns. Technical bulletin. 2008.

Madhav NV, Shakya AK, Shakya P, Singh K. Orotransmucosal drug delivery systems: a review. *J Control Release* 2009;140(1):2-11.

Mak V, Potts RO, Guy RH. Percutaneous penetration enhancement in vivo measured by attenuated total reflectance infrared spectroscopy. *Pharm Res* 1990;7(8):835-841.

Manosroi A, Kongkaneramt L, Manosroi J. Characterization of amphotericin B liposome formulations. *Drug Dev Ind Pharm* 2004;30(5):535-543.

Manzoni P, Farina D, Leonessa M, d'Oulx EA, Galletto P, Mostert M, et al. Risk factors for progression to invasive fungal infection in preterm neonates with fungal colonization. *Pediatrics* 2006;118(6):2359-2364.

Marcoux D, Jafarian F, Joncas V, Buteau C, Kokta V, Moghrabi A. Deep cutaneous fungal infections in immunocompromised children. *J Am Acad Dermatol* 2009;61(5):857-864.

Martin R, Soberon N, Vazquez F, Suarez JE. Vaginal microbiota: composition, protective role, associated pathologies, and therapeutic perspectives. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2008;26(3):160-167.

Martins HP, da Silva MC, Paiva LC, Svidzinski TI, Consolaro ME. Efficacy of fluconazole and nystatin in the treatment of vaginal *Candida* species. *Acta Dermatovenereologica* 2012;92(1):78-82.

Mediavilla A, Florez J. Fármacos antifúngicos. In: Florez J, editor. *Farmacología humana* Barcelona, España: Masson S.A; 1997. p. 1173-1186.

Megrab NA, Williams AC, Barry BW. Oestradiol permeation through human skin and silastic membrane and snake skin membranes: effects of ethanol water co-solvent systems. *International journal of pharmaceutics* 1995;116:101-112.

Mengual O, Meunier G, Cayre I, Puech K, Snabre P. Characterization of instability of concentrated dispersions by a new optical analyzer: the TURBISCAN MA 1000. *Colloids and surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 1999;152(1-2):111-123.

Merck Index. Merck Index. 1983.

Mistry A, Stolnik S, Illum L. Nanoparticles for direct nose-to-brain delivery of drugs. *Int J Pharm* 2009;379(1):146-157.

Mohandas V, Ballal M. Distribution of *Candida* species in different clinical samples and their virulence: biofilm formation, proteinase and phospholipase production: a study on hospitalized patients in southern India. *J Glob Infect Dis* 2011 Jan;3(1):4-8.

Montagna W. *The Structure and Fuction of Skin*. 2nd ed. New York: Academic Press; 1961.

Montenegro L, Carbone C, Paolino D, Drago R, Stancampiano AH, Puglisi G. In vitro skin permeation of sunscreen agents from O/W emulsions. *Int J Cosmet Sci*. 2008;30(1):57-65.

Moreno D, Zalba S, Colom H, Troconiz IF, Tros de Ilarduya C, Garrido MJ. Biopharmaceutic and pharmacodynamic modeling of the in vitro antiproliferative effect of new controlled delivery systems of cisplatin. *Eur J Pharm Sci* 2009;37(3-4):341-350.

Mousa HA. Fungal infection of burn wounds in patients with open and occlusive treatment methods. *East Mediterr Health J* 1999;5(2):333-336.

Müeller-Goymann K, Kriwet I, Eder I, Papantoniou I. Micro-emulsions and related systems for the dermal application of drugs. *Bull Tech Gattefosse* 1995;88:43-54.

Muller RH, Petersen RD, Hommoss A, Pardeike J. Nanostructured lipid carriers (NLC) in cosmetic dermal products. *advanced drug delivery reviews* 2007;59(6):522-530.

Muraa P, Fuccia MT, Bramantia G, Cortib P. Evaluation of transcutol as a clonazepam transdermal permeation enhancer from hydrophilic gel formulations. *European journal of pharmaceutical sciences : official journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences* 2000;9:365-372.

Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Pfaller MA, and Tenover FC, Tenover FC. *Manual of clinical microbiology*, 8th edition. Washington, DC: American Society for Microbiology Press, 2003.

Myc A, Vanhecke T, Landers JJ, Hamouda T, Baker JR, Jr. The fungicidal activity of novel nanoemulsion (X8W60PC) against clinically important yeast and filamentous fungi. *Mycopathologia* 2002;155(4):195-201.

7. BIBLIOGRAFÍA

Nachum Z, Shupak A, Gordon CR. Transdermal scopolamine for prevention of motion sickness : clinical pharmacokinetics and therapeutic applications. *Clin Pharmacokinet* 2006;45(6):543-566.

Nangia A, Berner B, Maibach HI. Transepidermal water loss measurements for assessing skin barrier functions during in vitro percutaneous absorption studies. In: Bronaugh RL, Maibach HI, editors. *Percutaneous Absorption Drugs, Cosmetics, Mechanisms, Methodology*. Drugs and the Pharmaceutical sciences. 3rd ed. New York: Marcel Dekker Inc.; 1999. p. 587-594.

Nicolaos G, Crauste-Manciet S, Farinotti R, Brossard D. Improvement of cefpodoxime proxetil oral absorption in rats by an oil-in-water submicron emulsion. *Int J Pharm* 2003;263(1-2):165-171.

Nicolazzo JA, Reed BL, Finnin BC. The effect of various in vitro conditions on the permeability characteristics of the buccal mucosa. *J Pharm Sci* 2003;92(12):2399-2410.

Niimi M, Firth NA, Cannon RD. Antifungal drug resistance of oral fungi. *Odontology* 2010;98(1):15-25.

Ogiso T, Iwaki M, Paku T. Effect of various enhancers on transdermal penetration of indomethacin and urea, and relationship between penetration parameters and enhancement factors. *J Pharm Sci* 199;84(4):482-488.

Organisation for economic co-operation and development (OECD). *Guideline for the Testing of Chemicals. Draft Guideline 428: Skin absorption: in vitro method*. 2000 Paris.

Pappas PG, Kauffman CA, Andes D, Benjamin DK, Jr, Calandra TF, Edwards JE, Jr, et al. Clinical practice guidelines for the management of candidiasis: 2009 update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis* 2009;48(5):503-535.

Park I, Kim D, Song J, In CH, Jeong SW, Lee SH, et al. Buprederm, a new transdermal delivery system of buprenorphine: pharmacokinetic, efficacy and skin irritancy studies. *Pharmaceutical research* 2008;25(5):1052-1062.

Pasqualotto AC. Candida and the paediatric lung. *Paediatr Respir Rev* 2009;10(4):186-191.

Patel VF, Liu F, Brown MB. Advances in oral transmucosal drug delivery. *J Control Release* 2011;153(2):106-116.

Peppas NA. Analysis of Fickian and non-Fickian drug release from polymers. *Pharm Acta Helv* 1985;60(4):110-111.

Picazo JJ, Gonzalez-Romo F, Candel FJ. Candidemia in the critically ill patient. *Int J Antimicrob Agents* 2008;32 Suppl 2:S83-5.

Pinto JF. Site-specific drug delivery systems within the gastro-intestinal tract: from the mouth to the colon. *Int J Pharm* 2010;395(1-2):44-52.

Potts RO, Golden GM, Francoeur MI, Mak V, Guy RH. Mechanism and enhancement of solute transport across the stratum corneum. *Journal of controlled release* 1991;15:249-260.

Ramage G, Mowat E, Jones B, Williams AC, Lopez-Ribot J. Our current understanding of fungal biofilms. *Crit Rev Microbiol* 2009;35(4):340-355.

Ramalingam K, Amaechi BT, Ralph RH, Lee VA. Antimicrobial activity of nanoemulsion on cariogenic planktonic and biofilm organisms. *Arch Oral Biol* 2012;57(1):15-22.

Ramos-E-Silva M, Lima CM, Schechtman RC, Trope BM, Carneiro S. Superficial mycoses in immunodepressed patients (AIDS). *Clin Dermatol* 2010;28(2):217-225.

Rao SVR, Agarwal P, Shao J. Selfnanoemulsifying drug delivery system (SNEEDS) for oral delivery of protein drugs. II. In vitro transport study. *International journal of pharmaceutics* 2008;362:10-15.

Rao J, McClements DJ. Formation of flavor oil microemulsions, nanoemulsions and emulsions: influence of composition and preparation method. *J Agric Food Chem* 2011;59(9):5026-5035.

Rashad UM, Al-Gezawy SM, El-Gezawy E, Azzaz AN. Honey as topical prophylaxis against radiochemotherapy-induced mucositis in head and neck cancer. *J Laryngol Otol* 2009;123(2):223-228.

Rautemaa R, Ramage G. Oral candidosis--clinical challenges of a biofilm disease. *Crit Rev Microbiol* 2011;37(4):328-336.

Ravi TPU, Padma T. Nanoemulsions for drug delivery through different routes. *Research in Biotechnology* 2011;2(3):1-13.

Recamier KS, Hernandez-Gomez A, Gonzalez-Damian J, Ortega-Blake I. Effect of membrane structure on the action of polyenes: I. Nystatin action in cholesterol- and ergosterol-containing membranes. *J Membr Biol* 2010;237(1):31-40.

Rodriguez IC, Cerezo A, Salem II. Sistemas de liberación bioadhesivos *Ars Pharmaceutica* 2000;41(1):115-128.

Sakeer K, Al-Zein H, Hassan I, Desai S, Nokhodchi A. Enhancement of dissolution of nystatin from buccoadhesive tablets containing various surfactants and a solid dispersion formulation. *Archives of Pharmacal Research* 2010a;33(11):1771-1779.

7. BIBLIOGRAFÍA

Sakeer K, Al-Zein H, Hassan I, Martin GP, Nokhodchi A. Use of xanthan and its binary blends with synthetic polymers to design controlled release formulations of buccoadhesive nystatin tablets. *Pharm Dev Technol* **2010b**;15(4):360-368.

Salamat-Miller N, Chittchang M, Johnston TP. The use of mucoadhesive polymers in buccal drug delivery. *advanced drug delivery reviews* 2005;57(11):1666-1691.

Samaranayake LP, Keung Leung W, Jin L. Oral mucosal fungal infections. *Periodontol* 2000 2009;49:39-59.

Sanglard D, Kuchler K, Ischer F, Pagani JL, Monod M, Bille J. Mechanisms of resistance to azole antifungal agents in *Candida albicans* isolates from AIDS patients involve specific multidrug transporters. *Antimicrob Agents Chemother* 1995;39(11):2378-2386.

Sankar V, Hearnden V, Hull K, Juras DV, Greenberg M, Kerr AR, et al. Local drug delivery for oral mucosal diseases: challenges and opportunities. *Oral Dis* 2011;17 Suppl 1:73-84.

Santos-Magalhaes NS, Pontes A, Pereira VM, Caetano MN. Colloidal carriers for benzathine penicillin G: nanoemulsions and nanocapsules. *Int J Pharm* 2000;208(1-2):71-80.

Santoyo S, Arellano A, Ygartua P, Martin C. In vitro percutaneous absorption of piroxicam through synthetic membranes and abdominal rat skin. *Pharm Acta Helv* 1996;71(2):141-146.

Sarabahi S, Tiwari VK, Arora S, Capoor MR, Pandey A. Changing pattern of fungal infection in burn patients. *Burns* 2012;38(4):520-528.

Sato K, Sugibayashi K, Morimoto Y. Effect and mode of action of aliphatic esters on the in vitro skin permeation of nicorandil *International journal of pharmaceutics* 1988;43(1-2):31-40.

Save T, Shah MU, Ghamande AR, Venkitachalam P. Comparative study of buccoadhesive formulations and sublingual capsules of nifedipine. *J Pharm Pharmacol* 1994;46(3):192-195.

Scheuplein RJ, Blank IH. Permeability of the skin. *Physiolog* 1971;51:702-747.

Schmalfluss U, Neubert R, Wohlrab W. Modification of drug penetration into human skin using microemulsions. *Journal of controlled release* 1997;46:279-285.

Schorling SR, Kortinga HC, Froschb M, Muhlschlegel FA. The role of *Candida dubliniensis* in oral candidiasis in human immunodeficiency virus-infected individuals. *Crit Rev Microbiol* 2000;26(1):59-68.

Semis R, Polacheck I, Segal E. Nystatin-intralipid preparation: characterization and *in vitro* activity against yeasts and molds. *Mycopathologia* 2010;169(5):333-341.

Shafiq S, Shakeel F, Talegaonkar S, Ahmad FJ, Khar RK, Ali M. Development and bioavailability assessment of ramipril nanoemulsion formulation. *Eur J Pharm Biopharm* 2007;66(2):227-243.

Shakeel F, Ramadan W. Transdermal delivery of anticancer drug caffeine from water-in-oil nanoemulsions. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2010;75(1):356-362.

Shakeel F, Ramadan W, Gargum HM, Singh R. Preparation and *in vivo* evaluation of indomethacin loaded true nanoemulsions. *Sci Pharm.* 2010; 78(1): 47–56.

Shim J, Kim MJ, Kim HK, Kim DH, Oh SG, Ko SY, et al. Morphological effect of lipid carriers on permeation of lidocaine hydrochloride through lipid membranes. *Int J Pharm* 2010;388(1-2):251-256.

Shojaei AH. Buccal mucosa as a route for systemic drug delivery: a review. *Journal of pharmaceutical sciences* 1998;1(1):15-30.

Siegman-Igra Y, Rabaw MY. Failure of fluconazole in systemic candidiasis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1992;11(2):201-202.

Siepmann J, Peppas NA. Modeling of drug release from delivery systems based on hydroxypropyl methylcellulose (HPMC). *advanced drug delivery reviews* 2001;48(2-3):139-157.

Singh SK, Durrani MJ, Reddy IK, Khan MA. Effect of permeation enhancers on the release of ketoprofen through transdermal drug delivery systems. *Pharmazie* 1996;51(10):741-744.

Singhi S, Deep A. Invasive candidiasis in pediatric intensive care units. *Indian J Pediatr* 2009;76(10):1033-1044.

Smolinski KN, Shah SS, Honig PJ, Yan AC. Neonatal cutaneous fungal infections. *Curr Opin Pediatr* 2005;17(4):486-493.

Sobel J. Vulvovaginal candidosis. *Lancet* 2007;369(9577):1961-1971.

Sobel J. Current treatment options for vulvovaginal candidiasis. *Womens Health (Lond Engl)* 2005;1(2):253-261.

Solans C, Izquierdo P, Nolla J, Azemar N, Garcia-Celma MJ. Nano-emulsions. *Current Opinion in Colloid and Interface Science* 2005;10:102-110.

7. BIBLIOGRAFÍA

Sole I, Pey CM, Maestro A, Gonzalez C, Porras M, Solans C, et al. Nano-emulsions prepared by the phase inversion composition method: preparation variables and scale up. *J Colloid Interface Sci* 2010;344(2):417-423.

Southwell D, Barry BW. Penetration enhancement in human skin; effect of 2-pyrrolidone, dimethylformamide and increased hydration on finite dose permeation of aspirin and caffeine. *International journal of pharmaceutics* 1984;22(2-3):291-298.

Soysa NS, Samaranayake LP, Ellepola AN. Cytotoxic drugs, radiotherapy and oral candidiasis. *Oral Oncol* 2004;40(10):971-978.

Squier CA, Kremer MJ. Biology of oral mucosa and esophagus. *J Natl Cancer Inst Monogr* 2001;(29)(29):7-15.

Stewart PS, Costerton JW. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *Lancet* 2001;358:135-138.

Still JM, Jr, Law EJ, Pereira GI, Singletary E. Invasive burn wound infection due to *Curvularia* species. *Burns* 1993;19(1):77-79.

Subcommittee on Antifungal Susceptibility Testing (AFST) of the ESCMID European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). EUCAST definitive document EDef 7.1: method for the determination of broth dilution MICs of antifungal agents for fermentative yeasts. *Clin Microbiol Infect* 2008;14(4):398-405.

Sudhakar Y, Kuotsu K, Bandyopadhyay AK. Buccal bioadhesive drug delivery--a promising option for orally less efficient drugs. *J Control Release* 2006;114(1):15-40.

Takanashi Y, Higashiyama K, Komiya H, Takayama K, Nagai T. Thiomenthol derivatives as novel percutaneous absorption enhancers. *Drug Dev Ind Pharm* 1999;25(1):89-94.

Takeuchi Y, Yasukawa H, Yamaoka Y, Taguchi K, Fukushima S, Shimonaka Y, et al. Behavior of propylene glycol (PG) in dermis after treatment of rat intact skin surface with fatty acids, fatty amines or azone dissolved in PG. *Biol Pharm Bull* 1995;18(2):304-309.

Takeuchi Y, Yasukawa H, Yamaoka Y, Takahashi N, Tamura C, Morimoto Y, et al. Effects of oleic acid/propylene glycol on rat abdominal stratum corneum: lipid extraction and appearance of propylene glycol in the dermis measured by Fourier transform infrared/attenuated total reflectance (FT-IR/ATR) spectroscopy. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 199;41(8):1434-1437.

Tamilvanan S, Benita S. The potential of lipid emulsion for ocular delivery of lipophilic drugs. *Eur J Pharm Biopharm* 2004;58(2):357-368.

Tanner T, Marks R. Delivering drugs by the transdermal route: review and comment. *Skin Res Technol* 2008;14(3):249-260.

Tanojo H, Bouwstra JA, Junginger HE, Bodde HE. In vitro human skin barrier modulation by fatty acids: skin permeation and thermal analysis studies. *Pharm Res* 1997;14(1):42-49.

Taylor LJ, Lee RS, Long M, Rawlings AV, Tubek J, Whitehead L, et al. Effect of occlusion on the percutaneous penetration of linoleic acid and glycerol. *Int J Pharm* 2002;249(1-2):157-164.

Tezer H, Canpolat FE, Dilmen U. Invasive fungal infections during the neonatal period: diagnosis, treatment and prophylaxis. *Expert Opin Pharmacother* 2012;13(2):193-205.

Thivolet J, Nicolas JF. Skin ageing and immune competence. *Br J Dermatol* 1990;122 Suppl 35:77-81.

Thomas BJ, Finnin BC. The transdermal revolution. *Drug Discov Today* 2004;9(16):697-703.

Tibaldi C, Cappello N, Latino MA, Masuelli G, Marini S, Benedetto C. Vaginal and endocervical microorganisms in symptomatic and asymptomatic non-pregnant females: risk factors and rates of occurrence. *Clin Microbiol Infect* 2009;15(7):670-679.

Tiwari SB, Amiji MM. Improved oral delivery of paclitaxel following administration in nanoemulsion formulations. *J Nanosci Nanotechnol* 2006;6(9-10):3215-3221.

Touitou E, Abed L. Effect of propylene glycol, Azone and n-decylmethyl sulphoxide on skin permeation kinetics of 5-fluorouracil *International journal of pharmaceutics* 1985;27(1):89-98.

Touitou E, Levi-Schaffer F, Dayan N, Alhaique F, Ricciari F. Modulation of caffeine skin delivery by carrier design: liposomes versus permeation enhancers *International journal of pharmaceutics* 1994;103(2):131-136.

Tsai TF, Maibach HI. How irritant is water? An overview. *Contact Dermatitis* 1999;41(6):311-314.

Turi JS, Danielson D, Woltersom JW. Effects of polyoxypropylene 15 stearyl ether and propylene glycol on percutaneous penetration rate of diflorasone diacetate. *J Pharm Sci* 1979;68(3):275-280.

Turnidge JD, Gudmundsson S, Vogelmann B, Craig WA. The postantibiotic effect of antifungal agents against common pathogenic yeasts. *J Antimicrob Chemother* 1994;34(1):83-92.

7. BIBLIOGRAFÍA

Valenta C, Wanka M, Heidlas J. Evaluation of novel soya-lecithin formulations for dermal use containing ketoprofen as a model drug. *Journal of controlled release* 2000;63(1-2):165-173.

van den Bergh BA, Swartzendruber DC, Bos-Van der Geest A, Hoogstraate JJ, Schrijvers AH, Bodde HE, et al. Development of an optimal protocol for the ultrastructural examination of skin by transmission electron microscopy. *J Microsc* 1997;187(Pt 2):125-133.

van der Valk PGM, Kucharekova M, Tupker RA. Transepidermal water loss and its relation to barrier function and skin irritation. In: Fluhr J, Elsner P, Berardesca E, Maibach HI, editors. *Bioengineering of the Skin, Water and the Stratum Corneum*. 2nd ed. FL.: Boca Raton: CRC Press; 2005. p. 97-104.

Venkateswarlu V, Manjunath K. Preparation, characterization and in vitro release kinetics of clozapina solid lipid nanoparticles. *Journal of controlled release* 2004;95:627-638.

Vyas TK, Shahiwala A, Amiji MM. Improved oral bioavailability and brain transport of Saquinavir upon administration in novel nanoemulsion formulations. *Int J Pharm* 2008;347(1-2):93-101.

Walker M, Hadgraft J. Oleic acid - a membrane fluidiser or fluid within the membrane. *International journal of pharmaceutics* 1991;71:R1-R4.

Wertz PW. The nature of the epidermal barrier: biochemical aspects. *Advanced Drug Delivery Reviews* 1996;18:283-294.

Wertz PW, Squier CA. Cellular and molecular basis of barrier function in oral epithelium. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst* 1991;8(3):237-269.

Wester RC, Maibach HI. Regional Variation in Percutaneous Absorption In: Bronaugh RL, Maibach HI, editors. *Percutaneous Absorption Drugs, Cosmetics, Mechanisms, Methods*. 4th ed. New York: Marcel Dekker Inc.; 1999. p. 219.

Wilkes GL, Brown IA, Wildnauer RH. The biomechanical properties of skin. *CRC Critical Reviews in Bioengineering* 1973;1(4):453-495.

Williams AC, Barry BW. The enhancement index concept applied to terpene penetration enhancers for human skin and model lipophilic (oestradiol) and hydrophilic (5-fluorouracil) drugs. *International journal of pharmaceutics* **1991a**;74:157-168.

Williams AC, Barry BW. Terpenes and the lipid-protein-partitioning theory of skin penetration enhancement. *Pharmaceutical research* **1991b**;8(1):17-24.

Wira CR, Rossoll RM, Kaushic C. Antigen-presenting cells in the female reproductive tract: influence of estradiol on antigen presentation by vaginal cells. *Endocrinology* 2000;141(8):2877-2885.

Woo KY, Sibbald RG, Ayello EA, Coutts PM, Garde DE. Peristomal skin complications and management. *Adv Skin Wound Care* 2009;22(11):522-32; quiz 533-4.

Worthington HV, Clarkson JE, Bryan G, Furness S, Glenny AM, Littlewood A, et al. Interventions for preventing oral mucositis for patients with cancer receiving treatment. *Cochrane Database Syst Rev* 2011;(4)(4):CD000978.

Wu H, Ramachandran C, Weiner ND, Roessler BJ. Topical transport of hydrophilic compounds using water-in-oil nanoemulsions. *Int J Pharm* 2001;220(1-2):63-75.

Wu T, Samaranayake LP, Cao BY, Wang J. In-vitro proteinase production by oral *Candida albicans* isolates from individuals with and without HIV infection and its attenuation by antimycotic agents. *J Med Microbiol* 1996;44(4):311-316.

Xiang J, Fang X, Li X. Transbuccal delivery of 2',3'-dideoxycytidine: in vitro permeation study and histological investigation. *Int J Pharm* 2002;231(1):57-66.

Yamada M, Uda Y. Enhancement of percutaneous absorption of molsidomine. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 1987;35:3390-3398.

Yamahara H, Lee VHL. Drug metabolism in the oral cavity. *Advanced Drug Delivery Reviews* 1993;12:25-40.

Yamashita F, Koyama Y, Kitano M, Takakura Y, Hashida M. Analysis of in vivo skin penetration enhancement by oleic acid based on a two-layer diffusion model with polar and nonpolar routes in the stratum corneum. *International journal of pharmaceutics* 1995;117(2):173-179.

Yum S, Lee E, Taskovich L, Theeuwes F. Permeation enhancement with ethanol: mechanism of action through skin. In: Hsieh DS, editor. *Drug Permeation Enhancement* New York: Marcel Dekker Inc.; 1994. p. 143-170.

Zager RA. Polyene antibiotics: relative degrees of in vitro cytotoxicity and potential effects on tubule phospholipid and ceramide content. *Am J Kidney Dis* 2000;36(2):238-249.

Zhao K, Singh J. Mechanisms of percutaneous absorption of tamoxifen by terpenes: eugenol, D-limonene and menthone. *J Control Release* 1998;55(2-3):253-260.

Zhou H, Yue Y, Liu G, Li Y, Zhang J, Gong Q, et al. Preparation and characterization of a lecithin nanoemulsion as a topical delivery system. *Nanoscale Res Lett* 2009;5(1):224-230.

7. BIBLIOGRAFÍA

Zhu W, Yu A, Wang W, Dong R, Wu J, Zhai G. Formulation design of microemulsion for dermal delivery of penciclovir. *Int J Pharm* 2008;360(1-2):184-190.

NANOEMULSIONES DE NISTATINA PARA
APLICACIÓN EN CANDIDIASIS MUCO-
CUTANEAS

ANEXO 1

RESUMEN

Actualmente existe un creciente interés en la mejora de las terapias farmacológicas existentes, no solo a través del descubrimiento de nuevos fármacos, sino mejorando la eficiencia de los ya existentes. De hecho las fórmulas farmacéuticas convencionales, presentan diversos efectos adversos debido a su administración oral.

Con el fin de evitar estos indeseables efectos adversos, las nuevas propuestas terapéuticas consisten en la investigación y desarrollo de formulaciones para vías de administración alternativas. Las rutas transdérmicas y transmucosa aparecen como unas rutas de administración alternativas muy interesantes para dar lugar a una absorción eficaz.

En este capítulo se describen las nuevas estrategias tecnológicas, biofarmacéuticas y farmacocinéticas de la aplicación de fármacos en la piel y en la mucosa oral.



Transworld Research Network
37/661 (2), Fort P.O.
Trivandrum-695 023
Kerala, India

Recent Advances in Pharmaceutical Sciences, 2011: 175-198 ISBN: 978-81-7895-528-5
Editor: Diego Muñoz-Torrero

8. Technological, biopharmaceutical and pharmacokinetic advances: New formulations of application on the skin and oral mucosa

Ana C. Calpena¹, Beatriz Clares² and Francisco Fernández¹

¹*Section of Biopharmacy and Pharmacokinetics, Department of Pharmacy and Pharmaceutical Technology, Faculty of Pharmacy, Barcelona University, Avenue Joan XXIII, 08028 Barcelona, Spain*

²*Department of Pharmacy and Pharmaceutical Technology, Faculty of Pharmacy Granada University, Campus de la Cartuja, 18071 Granada, Spain*

Abstract. Currently a growing interest to improve the pharmacological therapy exists, not only by the production and the appearance of new drugs, but guaranteeing that the uses of those which already exist, become more effective. In fact, the conventional pharmaceutical formulations of different drugs present a few secondary effects due to oral administration. In order to avoid these undesired side effects, the purpose of current therapeutic is the development and research of formulations as an alternative to others routes of administration. Therefore, in spite of the undoubtedly complete parenteral absorption, the transdermal and transbuccal routes appear to be a rather attractive alternative to provide an efficient absorption. In this chapter a new technological, biopharmaceutical and pharmacokinetic approach of strategies for application on skin and buccal mucosa are reported.

Correspondence/Reprint request: Dr. Ana C. Calpena Campmany, Section of Biopharmacy and Pharmacokinetic, Department of Pharmacy and Pharmaceutical Technology, Faculty of Pharmacy, Barcelona University, Avenue Joan XXIII, 08028 Barcelona, Spain. E-mail: anacalpena@ub.edu

In the future new transdermal drug delivery systems will emerge to be more effective, equipped with an improved aesthetic appearance, better adherence and greater diffusion. But to reach these aims, it is necessary previous knowledge of histology and physiology of skin, and factors involved in the penetration of drugs through it.

Introduction

The pharmaceutical sciences are faced with a need to develop alternative dosage forms for transdermal and transmucosal absorption. In addition to oral and parenteral routes, the suitable sites for administering drugs are the nasal, vaginal, rectal or ocular mucosa. However the oral mucosa represents the most popular route, because of its excellent permeability, good accessibility, high patient acceptance and compliance, the dosage forms can be easily attached to and removed from the mucosa. Moreover oral mucosa is routinely exposed to different compounds and therefore is supposed to be rather robust and less prone to irreversible irritation or damage by the drug, the dosage form, absorption promoters, etc. In fact, the turnover time for the buccal epithelium has been estimated at 5–6 days [1].

Within the oral mucosal cavity, the buccal region offers an attractive route of administration over peroral administration; buccal routes offer the advantages of avoiding hepatic first-pass metabolism, local intestinal enzymes and secretions and are deficient in enzymatic degradation.

In the other hand, the transdermal administration of drugs offers advantages that can enhance the therapeutic benefits of the active substances. This route of administration avoids the gastrointestinal tract and biotransformation due to the first-pass effect and metabolism in the liver. Drug release is targeted at the specific site where it is needed, and the percentage of absorption can be controlled. Delayed release formulations can be used. Systemic secondary effects are reduced, and topical formulations are easy to apply, a factor that improves patient compliance. Substantial concentrations of the drug can be reached in the soft tissues at the site of application. In addition, transdermal formulations can be used in readily accessible sites, and such formulations are nontoxic and easy to use.

These advantages, in both routes, are particularly useful with drugs that can break down in the gastrointestinal tract, or drugs used for long-term treatments, intravenously, or for osteoarticular wounds.

1. Anatomy, physiology and permeability of the oral mucosa and skin

Despite the advantages of transdermal and transbuccal pathways, the primary function of skin and oral mucosa is the protection of the underlying tissue. Therefore, to set the stage for subsequent discussion of strategies for

use of dosage forms in transdermal and transmucosal drug delivery, basic physiological characteristic of the skin and oral mucosa should be mentioned.

1.1. Oral mucosa

Drugs can be absorbed from any of the mucosal tissues in the oral cavity: maxillary artery supplies blood to buccal mucosa and blood flow is faster and richer (2.4 mL/min/cm²) than that in the sublingual (beneath the tongue), gingival and palatal regions, thus facilitates passive diffusion of drug molecules across the mucosa.

Buccal mucosa is composed of several layers of different cells, but consists principally of two components, an epithelium and an underlying connective tissue (basal lamina, propria lamina and submucosa). Also numerous racemose, mucous, serous glands and major blood vessels and nerves are present in the submucous tissue of the cheeks [2]. The epithelium of the human oral mucosa shows two distinct patterns of maturation, non-keratinized and keratinized. The most interesting, non-keratinized epithelium forms the surface of the distensible lining of the soft palate, ventral surface of the tongue, floor of the mouth, alveolar mucosa, vestibule, lips, and cheek.

The epithelium and its basal lamina constitute the major resistance barrier [3]. Substances can cross the buccal epithelial membrane by the mechanisms of simple diffusion, carrier-mediated diffusion (intercellular or intracellular), active transport, and endocytosis [4]. Most permeability studies (large molecules) point towards intercellular via [5].

The flux of drug through the membrane under sink condition for paracellular route can be written as Eq. (1)

$$J_p = \frac{D_p \varepsilon}{h_p} C_d$$

Where, **D_p** is the diffusion coefficient of the permeate in the intercellular spaces, **h_p** is the path length of the paracellular route, **ε** is the area fraction of the paracellular route and **C_d** is the donor drug concentration.

Similarly, flux of drug through the membrane under sink condition for transcellular route can be written as Eq. (2).

$$J_c = \frac{(1-\varepsilon)D_c K_c}{h_c} C_d$$

Where, **K_c** is the partition coefficient between lipophilic cell membrane and the aqueous phase, **D_c** is the diffusion coefficient of the drug in the transcellular spaces and **h_c** is the path length of the transcellular route [6].

In general, lipophilic drugs are absorbed through the intracellular route, whereas hydrophilic drugs are absorbed through the intercellular route, but the rate of penetration varies depending on the physicochemical properties of the molecule and the type of tissue being traversed. This has led to the suggestion that materials use one or more of the following routes simultaneously to cross the barrier region in the process of absorption, but one route is predominant over the other depending on the physicochemical properties of the diffusant [7]. So, the absorption potential of the buccal mucosa is influenced by the lipid solubility, molecular weight of the diffusant and carrier pH [8]. In addition, the microenvironment of the buccal cavity lends itself to modifications, in very few cases also the barriers such as saliva, mucus, membrane coating granules, retard the rate and extent of drug absorption through the buccal mucosa. All affects its bioavailability, hence development of unidirectional release systems with backing layer results high drug bioavailability [9].

1.2. Skin

The functions of the skin are thermoregulatory, immunological, mediation of sensation, social and protective. Barrier function plays the most important role in drug development and pharmacokinetic implications for both topically and systemically administered drugs. However the skin is the most accessible organ of the body but it is designed to isolate the organism from the external milieu, and thus poses a challenge to the pharmaceutical development of excipients that yield optimal permeation and cutaneous absorption of the active principles.

The skin is a complex organ consisting of three anatomical layers, the epidermis, the dermis and a subcutaneous fat layer. Moreover, the skin is pierced by the sebaceous and eccrine sweat glands and the hair follicles [10].

The epidermis is in humans 0.02-0.2 mm thin. The epidermis is made up of two layers: the stratum germinativum and the stratum corneum. The stratum corneum is a dead fully keratinised cells tissue. The functions are: protective, against external environment, occlusive, preventing body water loss (dehydration), and receptor for epidermal metabolic products. In fact, the stratum corneum provides the major barrier to penetration of topically applied drugs due to its lipid-rich nature and its low water content. The water content of the normal stratum corneum is 20-30%. The intracellular lipids consist of ceramides, fatty acids and cholesterol. There are also other intracellular lipids or lipids from the sebaceous glands or from epidermal fat [11].

The region below epidermis is called dermis. It supports and strengthens the epidermis. It ranges 5–20-times thicker than epidermis (approximately 2-3 mm thick). The dermis contains fibrous protein collagen, elastin,

histiocytes, mastocytes, water, ions, carbohydrates, blood and lymphatic vessels and nerves. The dermis is therefore a sensitive and highly irrigated tissue. Through the blood vessels in the dermis, the drugs enter the circulation system; firstly they have to cross the stratum corneum.

The subcutaneous fat layer or hipodermis represents the separation zone between the dermis and underlying tissues. It is composed of fat and elastic fibers. The hypodermis is the base of hair follicles and the sweat glands. It is also a well irrigated and innervated layer. Sometimes, the fat deposits may serve as a deep compartment for the drug and this can delay entry into the blood.

Number and type of hair follicles and glands is very relevant for drug penetration. In this zone of appendices, the stratum corneum thickness decreases, and even may disappear. Consequently the appendices are important access roads. The number of appendices varies depending on the species and anatomical region [12].

2. Cutaneous and transbuccal metabolism

Drug absorbed through the oral mucosa enters the systemic circulation directly via the jugular vein, avoiding the liver where they might be metabolized. However the drugs which are swallowed in the saliva do not avoid first pass metabolism and will be subjected to degradation by digestive juices. This may be partly overcome by using a drug delivery system which has a unidirectional drug outflow [13, 14].

Also, the enzymatic activity on the surface of the buccal mucosa should be evaluated as a barrier to drugs buccal delivery. In this way, the inclusion of enzyme inhibitors in buccal bioadhesive delivery systems could improve buccal bioavailability [15].

The viable part of the epidermis represents an enzymatic barrier for drugs after topical application. The distribution of the enzyme system will depend on the anatomical area and the species [16, 17], causing some differences in absorption and considerable transdermal first pass metabolism [18-20].

In vivo enzymatic activity in the epithelium can activate pro-drugs decreasing the delivery [21].

The stratum corneum can act as a reservoir for drugs, causing the pharmacological response to continue for a short time after the device has been removed. In other cases, depending on the delivery system, the drug will diffuse into underlying layers. The results presented indicate that most of the enzyme activity of the skin may be localized in the epidermal layer.

For this reason, the study of skin metabolism should take into account not only in the field of transdermal drug delivery but also for the safe and efficient local skin treatment with topically applied substances.

Finally, the oral mucosa contains the greatest variety of micro-organisms, which could alter drugs [22]. The entry into the body of these organisms is limited by the oral epithelium, which is not, as is often suggested, a highly permeable membrane.

Skin surface contains many and some potentially pathogenic microbiota. The drugs topically applied can be metabolised by bacteria on the skin surface [23]. Also, this bacterial population can encourage its growth due to heat or humidity transdermal system. It must be kept in mind when opening pores in skin and oral barrier.

Despite these disadvantages, the enzymes in the skin are essential in order to maintain skin good conditions contribute to the right skin pH and maintain skin protective capability against pathogens or reactive oxygen species.

Finally, it must be emphasized that the delivery system properties (e.g. permeation enhancers) and regional variations might be considered as a potential reason for inter- and intra-individual variations in metabolism and bioavailability of transdermally administered drugs [24, 25].

3. Pharmaceutical considerations

To a certain extent, the structure of the oral mucosa resembles that of the skin. For this reason some pharmaceutical considerations are general. Great care needs to be exercised while developing a safe and effective buccal adhesive drug delivery device. Factors influencing drug release and penetration through buccal mucosa, organoleptic factors, and effects of additives used to improve drug release pattern and absorption, the effects of local drug irritation caused at the site of application or texture of buccal mucosa, thickness of the mucus layer, its turn over time and effect of saliva are to be considered while designing a formulation. Also, the buccal epithelium is a lipoidal barrier, hence the majority of absorption of drugs is passive. However, some authors have demonstrated an active transport [26-28].

Another very important factor is the location of drug release system. The dosage form may be used as sublingual, buccal, local or periodontal delivery system. Variations in oral physiology will undoubtedly affect drug absorption.

In the other hand, the permeation of topically applied drugs into the systemic circulation consists of three phases:

- The release from the vehicle: the drug may be dissolved in the excipient and then diffuse to contact the skin surface.
- In a transdermal device, the primary design goal is the maintenance of the desired constant drug concentration at the skin surface for a suitable length of time.

- Penetration into the epidermis and permeabilization: Once the drug reaches the vehicle/skin surface interphase, it can penetrate through the sweat duct, hair follicles and sebaceous glands, being dissolved in sebum secretion (collectively called the shunt or transappendageal via) or directly across the stratum corneum (transepidermal via).
- The passage through the dermis and the entry into the systemic microcirculation.

There are several routes by which drugs can pass through the skin:

- The intercellular route, the passage of drug through the lipid matrix between corneocytes in the stratum corneum.
- The transcellular route, this occurs when drug passes through both the corneocytes and the lipid matrix within the stratum corneum.
- The appendageal route, the passage of drug through the appendages, such as hair follicles and sweat glands; therefore bypassing absorption through the stratum corneum.

The intercellular and transcellular route are also known as “transepidermal via”. It has been suggested that transappendageal via is more rapid than transepidermal via but it is considered unimportant. Transepidermal via is the most important pathway of passage, especially the intercellular route, but all this is depending on the molecules physicochemical properties.

Drug penetration through the skin depends on many factors, dependent on animal, drugs and formulation, which can modify the efficacy of a treatment.

The diffusion of drug across the stratum corneum is driven by a thermodynamic gradient and is not determined solely by a concentration gradient. According to Higuchi [29], drug permeation can be represented in a mathematical model for the purpose of predicting dermal absorption in this equation:

$$dQ/dt = P \cdot D \cdot S \cdot C/h$$

Where **S** corresponds to the total surface of application, **h** is the average thickness of the skin in this surface, **D** corresponds to the diffusion coefficient of a given drug across the skin, **C** is the applied drug concentration, and **P** the partition coefficient between the stratum corneum and the vehicle. From this equation it could be deduced the main factors affecting the rate of penetration:

3.1. Drug criteria

- Lipid/water partition coefficient. It is the most important factor of penetration in the stratum corneum, due to the lipid-rich nature of the

stratum corneum. Absorption of hydrophilic compounds is limited by the lipophilicity of the stratum corneum. However the dermis is much more hydrophilic than the stratum corneum and so act as a barrier to extremely hydrophobic compounds [30], once a hydrophilic compound has penetrated through this, it will partition readily into the epidermis and into systemic circulation [31]. So transdermal administration is ideal for substances with intermediate polarity.

- Molecular weight. This factor also impacts upon drug diffusion through the stratum corneum and dermis. Small molecules are more likely to cross skin. It is defined by its diffusion coefficient D , which is inversely proportional to the cube root of molecular weight. The larger the molecular weight, the lower the diffusion coefficient. However the lipophilic nature of the drug seems to play the most important role in this fact.
- Drug concentration. It is directly proportional to the penetration rate, although drug solubility in the vehicle, should not be exceeded.
- Degree of drug dissociation. It is depending not only on skin pH, but also on formulation pH.

Transdermal administration has several advantages, especially in those drugs with a low water solubility and low bioavailability, and/or those with a great first pass metabolism in comparison with the oral administration. Moreover, pre-systemic metabolism is avoided, permitting lower daily doses. Blood levels of the drug can be kept for extended periods of time prolonging drug action and reducing the dosing frequency. Inter and intra patient variability is reduced, and patient compliance and acceptability improved. Lastly, input of drug can be stopped by removal of the patch [32].

3.2. Vehicle criteria

The vehicle in which a drug is applied to the skin must be not only a support, but a delivery system that drives the drug to an appropriate area or biophase with an optimal rate of release. The absorption of a compound into the skin may be impeded if it is more soluble in the vehicle it is applied in than the stratum corneum [33]. Then it must exit an equilibrium between drug-vehicle and drug-skin affinity in order to ensure the maximal thermodynamic activity, and this is possible when the drug contained in the vehicle chamber is saturated. A lipophilic drug dissolved in an aqueous vehicle would be absorbed before than at the same concentration from a vehicle with other lipophilic solvent.

The vehicle is intended to function as a reservoir to provide a steady supply of drug and prolonging the effect. Therefore, it is important to take into consideration the vehicle effect will have on the dermal absorption drugs.

For a satisfactory release of drug from the vehicle, several conditions must be taken into account:

- Diffusion coefficient of drug in the vehicle must be optimal, for it drug must be solubilized, without possessing a selective affinity toward the vehicle.
- The lower the viscosity the greater the diffusion coefficient.
- Vehicle must improve the permeability by hydration, occlusion or direct penetration.
- Vehicle must not cause irritancy in the skin.

Optimization by a suitable formulation is responsible of residence time, local concentration of the drug in the mucosa and the amount of drug transported across the mucosa into the blood. The products for the buccal cavity must have good patient compliance, an ideal bioadhesive drug delivery system, should be easy to apply to the mucus and withstand salivation, tongue movement, and swallowing for a period of time. Buccal adhesive drug delivery systems with the size 1–3 cm² and a daily dose of 25 mg or less are preferable. The maximal duration of buccal delivery is approximately 4–6 h [34].

From a dermal point of view, the aim of skin applied formulations is to reach the skin surface, stratum corneum, viable epidermis, dermis, hair follicles, sweat glands or systemic circulation. Depending on the particular aim, the most appropriate biopharmaceutical and physicochemical aspects must be taken into account.

3.3. Others factors

Penetration of the substances into the skin can be modified by some factors as age, gender, location of the skin, skin damage or disease, as well as the well know regional variation in skin permeability to different molecules [35].

Also, tissue vascularity determines the rate of absorption. In man, dermal blood flow is about 2.5 mL min⁻¹ 100 g⁻¹.

Areas of the body where the stratum corneum is thickest, such as the palms of the hands (400 μm) and soles of the feet (600 μm) will be far less permeable to xenobiotic compounds than an area of the body where the stratum corneum is much thinner, such as the scrotum (5 μm) [36].

However several pharmacokinetic studies show bioequivalence of several anatomical sites after patch application: clonidine patch provides similar plasma concentration profile after application on arm and chest [37]. The rate

and extent of nicotine absorption from Nicoderm® were similar after application on upper outer arm, upper back and upper chest [38]. Plasma concentrations of norelgestromin and ethinyl estradiol from the contraceptive patch remain within the reference ranges throughout the wear period regardless of the application site [39].

Both, temperature and occlusion, increase passive diffusion [40].

Equally, in older people the stratum corneum thickens and becomes less hydrated, decreasing absorption [41].

Recent studies demonstrate that skin properties in the stratum corneum vary considerably among ethnic groups [42].

However, the main factors to consider are two: damage/disease of skin and its hydration. The skin sustains damage [43] or diseases [44, 45] can reduce barrier action and lead to increased permeability of the drugs. These processes are an important obstacle to the selection of the formulation. The degree of hydration of the skin improved contact and hydration of the lipid channels of the stratum corneum. When the skin is hydrated it reduces the evaporation of moisture from underlying tissues, so it is better to use emollients and occlusive substances that moisturizers. As a result, transdermal absorption increases.

4. Strategies for transdermal and transbuccal drug delivery systems: Current technologies of chemically and physically enhanced diffusive delivery

The objective of a transdermal and transbuccal delivery system is to provide a sustained concentration of drug for absorption avoiding local irritation. However the slow transport of many drugs across skin limits these administrations.

The administration of active principles on the skin and buccal mucosa with the aim of achieving a systemic and reservoir effect has led to pharmaceutical development of a new form of dosage. There are some methods by which penetration of compounds through the oral mucosa and skin can be improved: by the use of prodrug, co-administration of enzyme inhibitors, delivery systems, enhancers or physical methods. But particular caution should be taken with the creation of pores in the skin, as this has a large number and variety of microbiota, including pathogens.

4.1. Drug delivery system in buccal mucosa

Sublingual drug delivery is more commonly used to treat acute disorders, whereas the buccal route is chosen when a prolonged release of drug is needed

in chronic disorders [46]. However bioavailabilities of some drugs by the buccal route were still low due to its anatomical, physiological and technological factors such as texture of buccal mucosa, thickness of the mucus layer, its turnover time, effect of saliva, enzymatic barrier. These factors are to be considered in designing the dosage forms.

For example, one to two litres of fluid are excreted daily into the human mouth and there is a continuous, low basal secretion of 0.5 mL min^{-1} which will rapidly increase to more than 7 mL min^{-1} by the thought, smell or taste of food [47]. Therefore their contact with the oral mucosa is brief. In order to locally treat the mucosa, delivery systems have been designed to prolong residence in this area. These formulations include semisolid, mucoadhesive patches and bioadhesive tablets.

The use of adhesive polymers plays an important role in the development of mucoadhesive dosage forms, prolonging residence on the oral mucosa, improving absorption, targeting of specific tissues and allow for some degree of sustained release of the active principle [48]. Also some bioadhesive polymers, such as poly(acrylic acid), polycarbophil, and carbopol, can also inhibit certain proteolytic enzymes (trypsin, α -chymotrypsin, carboxypeptidases A and B, and leucine aminopeptidase) [49].

The polymers must have the following characteristics:

Polymer and its degradation products should be non-toxic, non-irritant, free from leachable impurities and easily available. Also they should have good spreadability, wetting, swelling and solubility, biodegradability, bioadhesive and viscoelastic properties, and should demonstrate local enzyme inhibition and penetration enhancement properties.

In general, buccal dosage forms can be categorized into unidirectional or multidirectional and reservoir or matrix type. They also must possess the requirements described above. If necessary, the drug may be formulated in certain physical states, such as microparticles [50], sponges [51], liposomes [52, 53] or nanoparticles [54, 55], prior to formulation of dosage form in order to achieve some desirable properties, e.g. enhanced activity and prolonged drug release.

Sprays and fast dissolving tablets are the two most widely used formulations for sublingual delivery. Tablets have been the most commonly investigated dosage form for buccal drug delivery to date, however they have a poor patient compliance.

Others dosage forms, such as buccal films and patches offer advantages due its flexibility and comfort [56]. Different drugs have been successfully studied obtaining optimal permeation values for a systemic effect [57, 58].

Certain bioadhesive polymers, e.g. pluronics show a phase change from a liquid to a semisolid with the corporal temperature. They have the advantage

of easy dispersion throughout the oral mucosa, rich retention at the site of application and adequate drug penetration [59].

In contrast to polymers utilized until now, a new generation of polymers can adhere directly to the cell surface, rather than to mucus [60].

4.2. Drug delivery system in skin

Currently the advances on transdermal delivery systems can be divided into three categories; physical methods, chemical methods and other complex systems. These last may include vesicles, eutectic mixtures, pro-drug, micelles, cyclodextrins microemulsions, nanoemulsions, cubic phases, colloids and synergistic mixtures.

It also noted the success in the permeation after the combination of several techniques such as chemical enhancers, physical enhancers and vesicles [61-63].

4.2.1. Other complex systems

4.2.1.1. Dosage forms (solid, liquid, semisolid)

Classical ointments, creams, lotions and gels are not suitable for action and/or controlled transdermal delivery.

When an active principle is administered topically, including in a conventional pharmaceutical way (solution, emulsion, gel...) through the skin, the latter has to release the active principle it contains so that it previously dissolves, is absorbed and reaches its area of activity, which in this case must be centred on the coetaneous tissue. Nevertheless, the arrival of the active principle at the area of activity may be insufficient; rather, by means of the circulating fluids, it can be distributed to certain tissues that can determine the emergence of undesirable effects.

On other occasions, the active principle reaches an adequate concentration of its specific receptors, but this concentration is maintained for a short period of time. This forces the administration of the active principle to be repeated at short intervals of time, using conventional dosage methods for immediate release.

From a pharmaceutical point of view, the solution to these problems could lie in the chemical association of the active substance with an appropriate delivery preparation capable of specificity of action [64]. In this way, vectoring is defined as the attainment of maximum efficacy of a drug, by increasing its release in the area where its pharmaceutical receptors are found, thereby minimizing its concentration in other areas of the organism, reducing the adverse effects. So, one of the objectives of pharmaceutical research in recent decades has been the development of systems that release the active

principle selectively at the level of the damaged organ, without producing changes in healthy tissue.

Several advances to this effect have been made in the last 2-3 decades and novel drug delivery systems have been investigated.

Ability to solubilize and stabilize drugs, their high viscosity hydromiscibility, thermosensitivity and micellar behavior make the Pluronic gels a feasible vehicle for oral and topical control drug delivery.

Gels of pluronic as the vehicles for the percutaneous administration of anti-inflammatory [65], analgesic [66], peptides [67], beta-blockers [68] and other active principles were studied and evaluated. Additionally, in the early 1990s Marty Jones and Lawson Kloesel [69] developed PLO (Pluronic Lecitin Organogel) as a transdermal drug carrier delivery system. Recently, efficacy of transdermal use of different drugs has been demonstrated.

Organogels are semi-solid systems, in which an organic liquid phase is immobilized by a three-dimensional network composed of self-assembled, intertwined gelator fibers [70, 71]. The application of different organogel systems to transdermal via has been studied [72, 73].

Microemulsions (clear, stable, isotropic mixtures of oil, water and surfactant in combination with a cosurfactant) are systems currently of interest to the pharmaceutical scientist because of their considerable potential to act as drug delivery transdermal vehicles (with diameters in the range of 20-100 nm) [74, 75]. However, it is necessary large amounts of surfactants to form microemulsions. Therefore, the use of these colloidal carrier systems in the future depends on the choice of well-tolerated surfactants and the restriction of their amounts.

Several excellent reviews discuss the advantages, limitations and opportunities offered by **patches** reservoir or matrix type in greater details and thus will not be covered in this review.

4.2.1.2. Nanosystems or vesicles

Compared with other external skin preparations, such as creams and liniments, nanosystems provide more adjustable parameters in their preparation, and in treatments offer the advantages of enhancing drug effects, shortening the expected treatment course and lowering side effects.

Among the multiple advantages of these vectors, the following are shown:

- Protects the active substance from deactivation (chemical, enzymatic or immunological), from the area of administration to the biophase.
- Improves transport of the active principles to places difficult to reach.
- Increases the specificity of action and efficacy at cellular and/or molecular level.

- Increases the average life span of the drug.
- Modifies the soluble properties of the active substance and reduces its immunogenicity and antigenicity.
- Decreases toxicity of certain organs by adjustment of the tissue distribution of the active principle.
- Lacking in toxicity, they are biodegradable and can be prepared industrially on a large scale.

The most important factor for potential nanotoxicity is the lack of biodegradability of many nanomaterials. After generation of these nanomaterials, they will stay forever and pollute the environment and, considering the circle in the environment, finally end up in the human body.

In the other hand, lipid analysis of buccal tissues shows the presence of phospholipid 76.3%, glucosphingolipid 23.0% and ceramide NS at 0.72%. Other lipids such as acyl glucosylated ceramide, and ceramides [76]. In Stratum corneum, cellular membranes of keratinocytes are composed mainly of phosphatidyl choline and sphingomyelin. Also, the intercorneocyte matrix is rich in phospholipids.

In view of the above, in recent years a great importance has been attached to using lipids as vehicular systems and permeants of active principles through the skin and oral mucosa. The outstanding advantage of lipid vesicles is their easy and complete biodegradation. Lipids are natural materials, are easily degraded by natural processes such as enzymes. Phospholipids as drug carriers have some unique advantages which other conventional external preparations do not have. Phospholipids share a high structural similarity with skin lipids and thus have many advantages. They can moreover affect molecular transport across skin barrier more directly by acting as skin permeation enhancers. This type of application is particularly suitable for certain chronic and relapsing skin diseases, such as chronic eczema, psoriasis, neurodermitis, etc.

Several different kinds of lipid vesicles have been described in the literature.

Liposomes consist of amphiphilic molecules in a bilayer conformation.

In an excess of water these amphiphilic molecules can form one (unilamellar vesicles) or more (multilamellar vesicles) concentric bilayers [77]. Due to its structure, hydrophilic, amphiphilic and lipophilic drugs can be entrapped.

In recent years, most investigators have concentrated on the potential use of liposomes for the transdermal delivery of antibiotics [78], antiviral [79], anesthetics [80] and antiinflammatories [81].

Niosomes are composed of non-ionic amphiphiles (surfactants) and are similar in function to the liposomes [82, 83].

Ethosomes are relatively new types of vesicle systems, primarily composed of water, ethanol and phospholipids [79].

Sufficiently deformable and elastic vesicles can enter skin barrier spontaneously, e.g. **transfersomes**, which cross the skin under the influence of a transepidermal water activity gradient. Transfersomes consist of phospholipids and an edge activator that increases the deformability of the bilayers and is often a single chain surfactant. Recent studies show the effectiveness of elastic liposomes for transdermal delivery of melatonin [84].

Solid Lipid Nanoparticles (SLN) and **Nanostructured Lipid Carriers (NLC)**, SLN are usually aqueous dispersions of solid lipid matrices stabilized by surfactants, or dry powders obtained by lyophilization [85] or spray drying [86], ranging from about 40 to 1000 nm. NCL are produced using blends of solid lipids and liquid lipids (oils) [87]. SLN and NLC exhibit many features for dermal application of cosmetics and pharmaceuticals, i.e. controlled release of actives, drug targeting, occlusion and associated with it penetration enhancement and increase of skin hydration. Specifically, since the last decade, SLN have been exploited for delivery of actives via dermal [88-91]. They are an alternative carrier system to emulsions, liposomes and polymeric nanoparticles. Drugs for dermal application using lipid nanoparticles at the present are glucocorticoids, retinoids, non-steroidal anti-inflammatory drugs, COX-2 inhibitors, psoralens and antimycotics. It was shown that it is possible to enhance the percutaneous absorption with lipid nanoparticles. These carriers may even allow drug targeting to the skin or even to its substructures. Thus they might have the potential to improve the benefit/risk ratio of topical drug therapy [92].

In the context it is noteworthy that physico-chemical characteristics of all these vesicles (size, charge, thermodynamic phase, lamellarity and bilayer elasticity) have a significant effect on the behaviour of the vesicles and hence on their effectiveness as a drug delivery system. Taking in account our aim they may serve as:

- A local depot for the sustained release of dermal active compounds.
- Penetration enhancer and facilitate dermal delivery leading to higher localized drug concentrations.
- Rate-limiting membrane barrier for the modulation of systemic absorption or controlled transdermal delivery systems.

4.2.2. Chemical enhancers

Generally the usual vehicles are not able to penetrate into stratum corneum by themselves. Penetration enhancement technology is a challenging

development that would increase the number of drugs available for transdermal administration. Thus for years different compounds capable of penetrating and transporting drugs have been studied, these are chemical substances temporarily diminishing the barrier of the skin and known as penetration promoters [93]. Promoters or accelerant can enhance drug flux, may act by one or more of three main mechanisms [94]:

- Disruption of the highly ordered structure of stratum corneum lipid.
- Interaction with intercellular protein.
- Improved partition of the drug, coenhancer or solvent into the stratum corneum.

The selection of enhancer and its efficacy depends on the physicochemical properties of the drug, site of administration, nature of the vehicle and other excipients. These permeation enhancers should be safe and non-toxic, pharmacologically and chemically inert, non-irritant, and non-allergenic. The different permeation enhancers available are:

- Chelators: EDTA, citric acid, sodium salicylate, methoxy salicylates.
- Surfactants: sodium lauryl sulphate, polyoxyethylene, Polyoxyethylene-9-laurylether, Polyoxyethylene-20-cetylether, Benzalkonium chloride, 23-lauryl ether, cetylpyridinium chloride, cetyltrimethyl ammonium bromide.
- Bile salts: sodium glycocholate, sodium deoxycholate, sodium taurocholate, sodium glycodeoxycholate, sodium taurodeoxycholate.
- Fatty acids: oleic acid, capric acid, lauric acid, lauric acid/propylene glycol, methyloleate, lysophosphatidylcholine, phosphatidylcholine.
- Non-surfactants: unsaturated cyclic ureas.
- Hydrocarbons: alkanes, alkenes, halogenated alkanes, squalane, squalene and mineral oil.
- Alcohols: alkanols, alkenols, glycols, polyglycols and glycerols.
- Amines, amides, esters as isopropyl myristate.
- Others: Terpenes, terpenoids, essential oils and phospholipids.
- Thiolated polymers: chitosan-4-thiobutylamide, chitosan-4-thiobutylamide/GSH, chitosan-cysteine, Poly (acrylicacid)-homocysteine, polycarbophil-cysteine, polycarbophil-cysteine/GSH, chitosan-4-thioethylamide/GSH, chitosan-4-thioglycolic acid.

In general, it is challenging to strike an optimum balance between the safety and potency of chemical enhancers. In order to develop a transdermal penetration enhancer which a low irritation to the skin, alkyldisiloxanes containing sugar moiety with various alkyl chain length were investigated [95].

Nevertheless studies show that treatment with enhancers did not cause major morphological changes in the buccal tissue [96].

Based on such limitations, one can design synthetic enhancers [97] that are significantly more potent in their skin permeabilizing ability as compared to conventional chemicals as Azone (1-dodecylazacycloheptan-2-one).

Also, these limitations can be solved by synergistic effects between enhancers [98] and more polar co-solvents (e.g. ethanol, propylene glycol). Similarly, solvents such as Transcutol® are proposed to act by improving drug solubility within the membrane rather than by increasing drug diffusivity across it [99].

4.2.3. Physical enhancers: Devices

The ideal characteristics an active principle should have to penetrate the stratum corneum are: Aqueous solubility 1 mg mL^{-1} , lipophilicity 10 Ko/w <1000, molecular weight <500 Da, melting point < 200 °C, pH of saturated aqueous solution pH 5-9, dose deliverable 10 mg/day.

Unfortunately, drugs such as peptides, proteins and oligonucleotides are usually large, polar and/or charged, characteristics that normally preclude transdermal delivery. However, recent advances in physical enhancement technologies solve these problems.

These methods employed for increasing transport of drug molecules across the skin use some form of mechanical, electrical, magnetic or thermal energy source to promote transport of macromolecules by disrupting the skin membrane. With these new technologies the number of drugs potentially useful for transdermal administration has greatly increased, and restrictions related to molecular weight, particle size, dosage, pH, etc. have been reduced.

Examples of physical approaches include the use of iontophoresis, electroporation, sonoporation, high velocity particles, ultrasound, electric current, abrasion, lasers, pressure waves, magnetophoresis and thermophoresis [100].

Other modern methods for skin barrier breaching are micro-scale devices for transdermal macromolecular delivery: liquid jet injectors, powder injectors, microneedles, and thermal microablation [101].

Some of the obstacles in transdermal physical enhancers can be overcome by combining with other physical enhancement techniques for the delivery of macromolecules [102, 103].

Similarly to transdermal, application studies on the mucosa physical enhancers improve the absorption of drugs, e.g. permeation of naltrexone on buccal mucosa was evaluated in presence of chemical enhancers or iontophoresis. No significant differences in penetration rate were observed

using chemical enhancers; in contrast, J_s and K_p were extensively affected by application of electric fields [104].

A particularly interesting perspective is the application of various physical methods used for gene delivery [105].

Finally, note that some of these methods as iontophoresis, can be used as an in-vivo model for studying physiologic mechanisms and on the analysis and interpretation of dose–response data [106].

5. Predicting transdermal and transbuccal delivery: In vitro - in vivo correlation

The main objective in the design and optimization of transdermal and transbuccal dosage forms lies in obtaining a good in vivo performance. Thus, one of the main challenges of biopharmaceutical research is finding a correlation between ex vivo, animal and human studies for prediction of percutaneous and transbuccal absorption in humans.

The permeability of oral mucosa and the efficacy of penetration enhancers have been investigated in numerous in vivo and in vitro models. Various types of diffusion cells, including continuous flow perfusion chambers, Franz cells and Grass-Sweetana cells, have been used to determine the permeability of oral mucosa [107]. Animal models generally are more available than human skin, but only rabbits and pigs have a non-keratinized mucosal lining similar to that in humans.

As for skin studies, several factors should be considered. The ideal model for in vitro permeation studies is the human skin. In this regard, skin from cadavers has approximately the same permeability as living skin, suggesting that the underlying tissues present little resistance to drug adsorption.

A wide range of animal models has been suggested as a suitable replacement for human skin and has been used to evaluate percutaneous permeation of molecules. However the most relevant animal model for human skin is the pig [108] and has less variability than the human skin model [109], also we can see that a synergistic mechanical and chemical on pig skin models exhibit similar permeabilities and pore radii, but the human skin models do not [110]. In fact, drug permeation through human skin at a selected skin site can vary from 46% to 66% among individuals [111]. Specifically, pig ear skin, which closely resembles human skin, is a candidate ex vivo alternative model for the investigation of xenobiotics penetration and metabolism. Also, due to its availability, skin of rodents (mice and rats) is commonly used in vitro and in vivo percutaneous permeation studies.

On the other hand several studies with frozen or fresh skin have been made, highlighting the similarities between the two procedures. However, in general, the results demonstrate that the permeability of the drugs across the skin depends on the storage condition, the length of storage, vehicle and the physicochemical properties of the drug under study [112-114].

To extrapolate the results obtained from experimentation with animal skin *in vitro* and *in vivo* to the human situation must be avoided unless scientific validation exists to show that this is appropriate for the given agent.

Cultured epithelial cell lines have also been developed as an *in vitro* model for studying drug transport and metabolism at biological barriers as well as to elucidate the possible mechanisms of action of penetration enhancers [115, 116]. However, the overall use of skin cultures is likely to be limited due to questionable performance as a barrier in skin permeation studies, as well as due to their cost and data reproducibility [117, 118].

In order to assess the potential of transdermal therapy have been developed some pharmacokinetic models which are based on the physicochemical properties of the penetrant. Most models have focused on the contributions of molecular size and the solubility in stratum corneum lipids. These models provide kinetic equations which allow calculation of the plasma levels achieved after a drug is applied transdermally and transbuccally. A database of *in vitro* skin permeability coefficient values has been consolidated and over 20 empirical equations have been published estimating permeability coefficients for chemicals penetrating the human skin from aqueous vehicles [119].

Plasma concentration time profiles for most of the transdermal and transbuccal systems are characterized in terms of AUC_{0-t} (area under the time concentration curve from time 0 to time t), $AUC_{0-\infty}$ (area under the time concentration curve from time 0 to infinity), C_{max} (maximal plasma drug concentration) and T_{max} (time to maximal plasma drug concentration). C_{max} provides a practical estimate of C_{ss} (plasma concentration at steady state) [120].

6. Conclusions

In many cases buccal and transdermal dose forms can obtain the same bioavailability as intravenous formulations without the disadvantages of this route of administration.

Despite the many advantages of the skin and oral mucosa as sites of drug delivery, only a few of drugs are currently in the market as transdermal delivery system (estradiol, ethinyl estradiol/levonorgestrol, ethinyl estradiol/norelgestromin, ethinyl estradiol/norethindrone, clonidine,

oxybutinin, fentanyl, methylphenidate, nicotine, nitroglycerin, selegiline, scopolamine, testosterone, rivastigmine and rotigotine).

Because the stratum corneum limits the amount of drug reaching the blood supply and unless the barrier function is reduced with a penetration enhancer it is unlikely that plasma levels above 100 ng/mL will be attained.

This paper explains why and how skin or oral mucosa preclude essentially any large molecules transport into body, the achievements of transdermal and transmucosal scientists and the new technologies for enhancement the dosage forms across these routes. In this way several physical, chemical and nanosystems methods have been investigated, which can only enhance the drug disposal in the skin and others however, could lead to therapeutic drug concentrations in the systemic circulation.

To face the design of these and others excipients, “in vitro” release studies will constitute an essential tool for its development. It also will let us know the dermal penetration values of drugs and the effectiveness of vehicles.

Therefore, in order to assess the potential of transdermal or transbuccal therapy, it is necessary the development of more experiences and new release vehicles for transdermal and transbuccal drugs.

Lastly it should be noted that other routes, such as nasal, ocular, pulmonary, rectal, and vaginal drug administration, have provided excellent opportunities for the delivery of a variety of compounds.

References

1. Harris, D., Robinson, J. R. 1992, *J. Pharm. Sci.*, 81, 1.
2. Collins, L. M. C., Dawes, C. 1987, *J. Dent. Res.*, 66, 1300.
3. Squier, C. A., Finkelstein, M. W. 1989, *Oral Histology, Development, Structure and Function*, A. R. Ten Cate (Ed.), C.V. Mosby, St. Louis, 345.
4. Siegel, I. A. 1984, *The Structure and Function of Oral Mucosa*, J. Meyer, C. A. Squier, S. J. Gerson (Eds.), Pergamon Press, Oxford, 125.
5. Squier, C. A. 1973, *J. Ultrastruct. Res.*, 43, 160.
6. Shojaei, A. H., Li, X. 1997, *Proc. Int. Symp. Control Release Bioact. Mater.* 24, 427.
7. Hao, J., Heng, P. W. S. 2003, *Drug Dev. Ind. Pharm.* 29, 821.
8. Nielsen, H. M., Rassing, M. R. 1999, *Int. J. Pharm.* 185, 215.
9. Weathercell, J. A., Robinson, C., Rathbone, M. J. 1994, *Adv. Drug Del. Rev.* 130, 24.
10. Montagna, W. 1961, *The Structure and Fuction of Skin*, 2nd Ed, Academic Press, New York, 454.
11. Wertz, P. W. 1996, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 18, 283.
12. Monteiro-Riviere N. 1990, *Appl. Toxicol.*, 15, 74.

13. Darwish, A. M., El-Sayed, A. M., El-Harras, S. A., Khaled, K. A., Ismail, M. A. 2008, *Fertil. Steril.*, 90, 1864.
14. Lei, L., Liu, X., Guo, S., Tang, M., Cheng, L., Tian, L. 2010, *J. Control. Release*, 146, 45.
15. Walker, G. F., Langoth, N., Bernkop-Schnürch, A. 2002, *Int. J Pharm.*, 233, 141.
16. Martin, R. J., Denyer, S. P., Hadgraft, J. 1987, *Int. J. Phann.* 39, 23.
17. Moody, R. P., Nadeau, B., Chu, I. 1995, *J. Dermatol. Sci.*, 9, 48.
18. Hsia, S. L., Hao, Y. L. 1966, *Biochem.* 5, 1469.
19. Goebel, C., Hewitt, N. J., Kunze, G., Wenker, M., Hein, D. W., Beck, H., Skare, J. 2009, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 235, 114.
20. Mazer, N. A., Heiber, W. E., Moellmer, J. F., Meikle, A. W., Stringham, J. D., Sanders, S. W., Tolman, K. G., Odell, W. D. 1992, *J. Control. Release*, 19, 347.
21. Adachi, H., Irie, T., Uekama, T., Manako, T., Yano, T., Saita, M. 1993, *Eur. J. Pharm. Sci.*, 1, 117.
22. Yamahara, H., Lee, V. H. L. 1993, *Adv. Drug Del. Rev.*, 12, 25.
23. Denyer, S. P., McNabb, C. 1989, *Transdermal Drug Delivery*, J. Hadgraft, and R.H. Guy (Eds.), Marcel Dekker, New York, 113.
24. Lefèvre, G., Sedek, G., Huang, H. L., Saltzman, M., Rosenberg, M., Kiese, B., Fordham, P. 2007, *J. Clin. Pharmacol.* 47, 471.
25. Berner, B., John, V. A., 1994. *Clin. Pharmacokinet.* 26, 121.
26. Sadoogh-Abrasian F., Evered, D. F. 1979, *Br. J. Nutr.*, 42,15.
27. Evered, D. F., Sadoogh-Abrasian F., Patel, P. D. 1980, *Life Sci.*, 27, 1649.
28. Evered, D.F., Mallett C. 1983, *Life Sci.*, 32, 1355.
29. Higuchi, T. 1960, *J. Soc. Cosm. Chem.*, 11, 85.
30. Barry, B. W. 2004, *Nat. Biotechnol.*, 22, 165.
31. Bronaugh, R. L., 2004, *Dermatotoxicology*, 6th edition, H. Zhai, and H.I. Maibach (Eds.), CRC Press New York, 519.
32. Delgado-Charro, M. B., Guy, R. H. 2001, *Drug Delivery and Targeting for Pharmacists and Pharmaceutical Scientists*, A.M. Hillery, A.W. Lloyd, and J. Swarbrick (Eds.), Harwood Academic Publishers, London, 207.
33. Jacobi, U., Tassopoulos, T., Surber, C., Lademann, J. 2006, *Arch. Dermatological Res.*, 297, 303.
34. Alur, H. H., Johnston, T. P., Mitra, A. K. 2001, *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology*, J. Superbrick, and J. C. Boylan (Eds.), Marcel Dekker Inc., New York, 193.
35. Maibach, H. I., Feldmann, R. J., Hilby, T. H., Servat, W. F. 1971, *Arch. Environ. Health*, 23, 208.
36. Scheuplein, R. J., Blank, I. H. 1971, *Physiol. Rev.*, 51, 702.
37. MacGregor, T. R., Matzek, K. M., Keirns, J. J., vanWayjen, R. G., van den Ende, A., van Tol, R. G. 1985. *Clin. Pharmacol. Ther.*, 38, 278.
38. Gorsline, J., Okerholm, R. A., Rolf, C. N. 1992. *J. Clin. Pharmacol.*, 32, 576.
39. Abrams, L. S., Skee, D. M., Natarajan, J., Wong, F. A., Anderson, G. D. 2002, *Br. J. Clin. Pharmacol.*, 53, 141.
40. Feldmann R. J., Maibabach, H. I. 1965, *Arch. Dermatol.*, 91, 661.
41. Barrett, D. A., Rutter, N. 1994, *Crit. Rev. Therapeut. Drug Carrier Syst.*, 11, 1.

42. Muizzuddin, N., Hellemans, L., Van Overloop, L., Corstjens, H., Declercq, L., Maes, D. 2010, *J. Dermatol. Sci.*, 59, 123.
43. Maibach, H. I. 1976, *Dermatol.*, 152, 11.
44. Turpeinen, M. 1988, *Br. J. Dermatol.*, 118, 517.
45. Kalish, R., Wood, J. A., Wille, J. J., Kydonieus, A. 1996, *Contact Dermatitis*, 35, 76.
46. Rossi, S., Sandri, G., Caramella, C. M., 2005. *Drug Discov. Today: Technol.*, 2, 59.
47. Shannon, I. L., Prigmore, J. R. 1958, *Proc. Soc. Expt. Biol. Med.*, 97, 825.
48. Leung, S. -H. S., Robinson, J. R., 1991, *Water- Soluble Polymers. Synthesis, Solution, Properties and Applications*, S. W. Shalaby, C. L. McCormick, and G. B. Butler (Eds.), Washington, DC, 350.
49. Lueßen, H. L. Verhoef, J. C., de Boer, A. G. Junginger, H. E. de Leeuw, B. J. Borchard, G., Lehr, C. M., 1999, *Bioadhesive Drug Delivery Systems. Fundamentals, Novel Approaches, and Development*, E. Mathiowitz, D. E. Chickering III, and C. M. Lehr (Eds.), Marcel Dekker, New York, 299.
50. Giunchedi, P., Juliano, C., Gavini, E., Cossu, M., Sorrenti, M. 2002, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 53, 233.
51. Portero, A., Teijeiro-Osorio, D., Alonso, M. J., Remuñán-López, C. 2007, *Carbohydr. Polym.*, 68, 617.
52. El-Samaligy, M. S., Afifi, N. N., Mahmoud, E. A. 2006, *Int. J. Pharm.*, 308, 140.
53. Veuillez, F., Kalia, Y. N., Jacques, Y., Deshusses, J., Buri, P. 2001, *Eur. J. Pharm Biopharm.*, 51, 93.
54. Lopodota, A., Trapani, A., Cutrignelli, A., Chiarantini, L., Pantucci, E., Curci, R., Manuali, E., Trapani, G. 2009, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 72, 509.
55. He, C., Cui, F., Yin, L., Qian, F., Tang, C., Yin, C. 2009, *Eur. Polym. J.*, 45, 368.
56. Morales, J. O., McConville, J. T. 2011, *Eur. J. Pharm Biopharm.*, in press.
57. Díaz del Consuelo, I., Falson, F., Guy, R. H., Jacques, Y. 2007, *J. Contr. Release*, 122, 135.
58. Perioli, L., Ambrogi, V., Angelici, F., Ricci, M., Giovagnoli, S., Capuccella, M., Rossi, C. 2004, *J. Contr. Release*, 99, 73.
59. Morishita, M., Barichello, J. M., Takayama, K., Chiba, Y., Tokiwa, S., Nagai, T. 2001, *Int. J. Pharm.*, 212, 289.
60. Lehr, C. M. 2000, *J. Control. Release*, 65, 19.
61. Nair, V., Panchagnula, R. 2003, *Pharmacol. Res.*, 43, 555.
62. Qiu, Y., Gao, Y., Hu, K., Li, F. 2008, *J. Control. Release*, 129, 144.
63. Kajimoto, K., Yamamoto, M., Watanabe, M., Kigasawa, K., Kanamura, K., Harashima, H., Kogure, K. 2011, *Int. J Pharm.*, 403, 57.
64. Ruiz, M. A., Clares, B., Morales, M.E., Gallardo, V. 2008, *Drug Dev. Ind. Pharm.*, 34, 1269.
65. Miyazaki, S., Yokouchi, C., Nakamura, T., Hashiguchi, N., Hou, W. M., Takada, M. 1986, *Chem. Pharm. Bull.*, 34,1801.
66. Lee, B. J., Lee, T. S., Cha, B. J, Kim, S. H., Kim, W. B. 1997, *Int. J. Pharm.*, 159, 105.
67. Pillai, O., Panchagnula, R. 2003. *J. Control. Release*, 89, 127.

68. Stamatialis, D. F., Rolevink, H. H. M., Koops, G. H. 2006, *J. Contr. Release*, 116, e53.
69. Murdan, S. 2005, *Hospital Pharmacist*, 12, 267.
70. Vintiloiu, A., Leroux, J. C. 2008, *J. Control. Release*, 125, 179.
71. Ruiz, M. A., Clares, B., Morales, M. E., Gallardo, V. 2007, *Pharm. Dev. Technol.*, 12, 637.
72. Paice, J. A., Von Roenn, J. H., Hudgins, J. C., Luong, L., Krejcie, T. C., Avram, M. J. 2008, *J. Pain Symptom Manage.*, 35, 314.
73. Morales, M. E., Clares, B., López-Viota, V., Ruíz, M. A. 2008, *Drug Deliv.*, 15, 373.
74. Escribano, E., Calpena, A. C., Queralt, J., Obach, R., Doménech, J. 2003, *Eur. J. Pharm. Sci. Eur. J. Pharm. Sci.*, 19, 203.
75. Yuan, J. S., Yip, A., Nguyen, N., Chu, J., Wen, X. S., Acosta, E. J. 2010, *Int. J. Pharm.*, 392, 274.
76. Fox, P. C. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 842, 132.
77. Bangham, A. D; Standish, M. M; Walkins, J. C. 1965, *J. Mol. Biol.*, 13, 238.
78. Manosroi, A., Kongkaneramt, L., Manosroi J. 2004, *Int. J. Pharm.*, 270, 279.
79. Dubey, V., Mishra, D., Nahar, M., Jain, V., Jain, N. K. 2010, *Nanomedicine*, 6, 590.
80. Shim, J., Kim, M. J., Kim, H. K., Kim, D. H., Oh, S. G., Ko, S. Y., Jang, H. G., Kim, J. W. 2010, *Int. J. Pharm.*, 388, 251.
81. Clares, B., Medina, M. M., Gallardo, V., Ruíz, M. A. 2009, *J. Liposome Res.*, 19, 197.
82. Choi, M. J., Maibach, H. I. 2005, *Skin Pharmacol. Physiol.*, 18, 209.
83. Uchegbu, I. F., Vyas, S. P. 1998, *Int. J. Pharm.*, 172, 33.
84. Dubey, V., Mishra, D., Asthana, A., Jain, N. K. 2006, *Biomaterials*, 27, 3491.
85. Lim, S. J., Kim, C. K. 2002, *Int. J. Pharm.*, 243, 135.
86. Freitas, C., Müller, R. H. 1999, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 47, 125.
87. Müller, R. H., Olbrich, C. 2000, *Pharmazeutische Biotechnologie*, W. Verlagsgesellschaft (Ed), Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart, 283.
88. Müller, R. H., Petersen, R. D., Hommos, A., Pardeike, J. 2007. *Adv. Drug Del. Rev.*, 59, 522.
89. Souto, E. B., Almeida, E. J., Müller, R. H. 2007, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 3, 317.
90. Priano, L., Esposti, D., Esposti, R., Castagna, G., De Medeci, C., Fraschini, F., Gasco, M. R. 2007, *J. Nanosci. Nanotechnol.*, 7, 1.
91. Liu, W., Hu, M., Liu, W., Xue, C., Xu, H., Yang, X. L. 2008, *Int. J. Pharm.*, 364, 135.
92. Schäfer-Korting, M., Mehnert, W., Korting, H. C., 2007. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 59, 427.
93. Calpena, A. C., Lauroba, J., Suriol, M., Obach, R., Domenech, J. 1994, *Int. J. Pharm.*, 2, 179.
94. Pathan, I. B, Setty, C. M. 2009, *Trop. J. Pharm. Res.*, 8, 173.
95. Akimoto, T., Nagase, Y. 2003, *J. Control. Release*, 88, 243.
96. Hu, L., Damaj, B. B., Martin, R., Michniak-Kohn, B. B. 2011, *Int. J. Pharm.*, 404, 66.

97. Brychtova, K., Jampilek, J., Opatrilova, R., Raich, I., Farsa, O., Csollei, J. 2010, *Bioorg. Med. Chem.*, 18, 73.
98. Lee, P. J., Ahmad, N., Langer, R., Mitragotri, S., Shastri, V. P. 2006, *Int. J. Pharm.*, 308, 33.
99. Harrison, J.E., Watkinson, A.C., Green, D.M., Hadgraft, J., Brain, K. 1996, *Pharm. Res.*, 13, 542.
100. Cevc, G., Vierl, U., 2010, *J. Control. Release*, 141, 277.
101. Arora, A., Prausnitz, M. R., and Mitragotri, S. 2008, *Int. J. Pharm.*, 364, 227.
102. Chen, H., Zhu, H., Zheng, J., Mou, D., Wan, J., Zhang, J., Shi, T., Zhao, Y., Xu, H., Lefèvre, X., Yang, G. 2009, *J. Control. Release*, 139, 63.
103. Yan, K., Todo, H., Sugibayashi, K. 2010, *Int. J. Pharm.*, 397, 77.
104. Giannola, L. I., Caro, V. D., Giandalia, G., Siracusa, M. G., Tripodo, C., Florena, A. M., Campisi, G. 2007, *Eur. J. Pharm. and Biopharm.*, 67, 425.
105. Jinturkar, K. A., Rathi, M. N., Misra, A. 2011, *Chal. Del. Ther. Genomics Proteomics*, 83.
106. Tesselaar, E., Sjöberg, F. 2011, *Microvasc. Res.*, 81, 88.
107. Squier, C. A., Kremer, M.J., and Wertz, P.W. 1997, *J. Pharm. Sci.*, 86, 82.
108. Sekkat, N., Kalia, Y. N., Guy, R. H.. 2004, *Pharm. Res.*, 21, 1390.
109. Barbero, A. M., Frasc, F. 2009, *Toxicol. in Vitro*, 23, 1.
110. Seto, J. E., Polat, B. E., Lopez, R. F. V., Blankschtein, D., Langer, R. 2010, *J. Control. Release*, 145, 26.
111. Grond, S., Radbruch, L., Lehmann, K. A., 2000. *Clin. Pharmacokinet.*, 38, 59.
112. Babu, R. J., Kanikkannan, N., Kikwai, L., Ortega, C., Andega, S., Ball, K., Yim, S., Singh, M. 2003, *J. Control. Release*, 86, 49.
113. Brain, K. R., Walters, K. A., Green, D. M., Brain, S., Loretz, L.J., Sharma, R. K., Dressler, W. D. 2005, *Food Chem. Toxicol.*, 43, 681.
114. Sintov, A. C., Botner, S. 2006, *Int. J. Pharm.*, 311, 55.
115. Audus, K. L. 1996, *Oral Mucosal Drug Delivery*, M.J. Rathbone (Ed.), Marcel Dekker, New York, 101.
116. Nielsen, H. M., Rassing, M. R. 1999, *Int. J. Pharm.*, 185, 215.
117. Schmook, F. P., Meingassner, J. G., Billich, A. 2001, *Int. J. Pharm.*, 14, 51.
118. Netzlaff, F., Lehr, C. M., Wertz, P. W., Schaefer, U. F. 2005, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 60, 167.
119. Vecchia, B. E., Bunge, A. L. 2003, *Transdermal Drug Delivery*, R.H. Guy, and J. Hadgraft,(Eds.), Marcel Dekker, New York, 25.
120. Farahmand, S., Maibach, H. I. 2009, *Int. J. Pharm.*, 367, 1.