



UNIVERSITAT DE  
BARCELONA

# Estudi galènic i biofarmacèutic d'emulsions múltiples de clotrimazol, econazol i bifonazol d'aplicació tòpica

Joaquim Suñer i Carbó

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

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

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



UNIVERSITAT DE  
BARCELONA

FACULTAT DE FARMÀCIA I CIÈNCIES DE L'ALIMENTACIÓ  
DEPARTAMENT DE FARMÀCIA I TECNOLOGIA FARMACÈUTICA  
I FÍSICOQUÍMICA

Tesi Doctoral

**“ESTUDI GALÈNIC I BIOFARMACÈUTIC  
D’EMULSIONS MÚLTIPLES DE CLOTRIMAZOL,  
ECONAZOL I BIFONAZOL D’APLICACIÓ TÒPICA”**

Joaquim Suñer i Carbó

Juny 2017





UNIVERSITAT DE  
BARCELONA

FACULTAT DE FARMÀCIA I CIÈNCIES DE L'ALIMENTACIÓ  
DEPARTAMENT DE FARMÀCIA I TECNOLOGIA FARMACÈUTICA  
I FISCOQUÍMICA

Programa de Doctorat:  
Recerca, Desenvolupament i Control de Medicaments (H0B01)

**“ESTUDI GALÈNIC I BIOFARMACÈUTIC  
D’EMULSIONS MÚLTIPLES DE CLOTRIMAZOL,  
ECONAZOL I BIFONAZOL D’APLICACIÓ TÒPICA”**

Memòria presentada per Joaquim Suñer i Carbó per optar al títol de Doctor  
per la Universitat de Barcelona.

Directores:

Dra. Ana C. Calpena i Campmany

Dra. Lyda Halbaut Bellowa

Tutora:

Dra. Ana C. Calpena i Campmany

Doctorand:  
Joaquim Suñer i Carbó

Juny 2017



# AGRAÏMENTS

---



## **Agraïments:**

Escriure una Tesi Doctoral suposa un repte llarg i complexa. Des de l'elecció del punt de treball, segueix, la dedicació de un gran nombre d'hores, a cops repetir la feina quan surten nous aspectes, esperats o no. A vegades també comporta un gran sacrifici familiar, i sempre moltes més hores, que el doctorand espera a priori dedicar-hi, tot i conèixer les experiències prèvies d'altres companys. A mes cal afegir-hi que una tesi doctoral no es limita a la tasca purament personal, cal l'ajut de tot un entorn per portar-ho a bon cap. Per tant és el moment de valorar i agrair aquest suport de moltes persones que han acompanyat aquest doctorand en tot aquest llarg camí.

En la part bàsica, ja comentada, de l'elecció del tema i el corresponent assessorament, guia el meu reconeixement i gratitud a les meves directores, la Dra. Ana Cristina Calpena i Campmany, i Dra. Lyda Halbaut i Bellowa. A la Dra. Calpena li dec l'haver-me introduït en aquest fascinant món que és la Biofarmàcia i als estudis d'alliberació i permeació de fàrmacs, on n'he sortit fascinat i gratament sorprès. A la Dra. Halbaut, per introduir-me ja molts anys en la Farmàcia Galènica, i a més companya infatigable en la docència i pràctiques de Galènica i TEFIG, per haver-me també format en l'anàlisi reològica i fer d'aquesta tècnica, quelcom més entenedor. Però apart del suport en les qüestions purament tècniques, en ambdues he trobat un punt tan necessari en tota ocupació científica, el seu positivisme i energia, un suport moral tan necessari en certs moments. De tot cor, gràcies.

La feina feta s'ha de comunicar i fer-ho de manera assequible. És en aquest sentit que he de reconèixer i agrair l'assessorament del Dr. Antoni Boix i Montañés, professor de la Unitat de Biofarmàcia i Farmacocinètica de la Universitat de Barcelona per haver-me introduït en el món de les publicacions científiques en revistes de prestigi internacional en el que és realment un autèntic expert. Els seus amplis coneixements i consells m'han servit per tirar endavant aquest projecte. A la Dra. Beatriz Clarés i Naveros, professora del Departament de Tecnologia Farmacèutica de la Facultat de Farmàcia de la Universitat de Granada per haver-me introduït també en el món de les publicacions científiques.

A la Dra. M<sup>a</sup> Luisa Garcia i López del Departament de Farmàcia i Tecnologia Farmacèutica i Físico-Química per iniciar-me en el camp de les determinades tècniques fisicoquímiques, un món també apassionant com la difracció làser per poder determinar la mida de partícula, com també de l'anàlisi òptica per la tècnica de dispersió de llum múltiple (o "*Multiple Light Scattering*") per a la predicció de l'estabilitat de sistemes dispersos amb el dispositiu Turbiscan<sup>®</sup>. A la Dra. M<sup>a</sup> Antònia Busquets i Viñas, també del Departament de Farmàcia i Tecnologia Farmacèutica i Físico-Química per la seva ajuda en la posada a punt de la presentació d'aquesta memòria. Mercès també a la Dra. Judith Tulla i Puche per la seva ajuda en la revisió de les parts en anglès d'aquesta memòria.

Al Dr. Jaume Notario Rosa, metge dermatòleg, del Servei de Dermatologia de Ciutat Sanitària i Universitària de Bellvitge per haver-me facilitat fotografies del seu banc personal d'imatges de les principals infeccions fúngiques superficials. També a la Dra. Nuria Bozal de Febre i la Dra. M<sup>a</sup> Jesús Montes López del Departament de Microbiologia de la Universitat de Barcelona per la seva valuosa ajuda durant els assajos d'eficàcia antimicrobiana dels diferents sistemes dispersos preparats.



Continuant una referència per la Dra. Esther Torres i Farrés ja que la seva investigació en els camps dels sistemes dispersos, tipus emulsions múltiples, ha estat un referent per al desenvolupament de la meua tasca investigadora. Vull també manifestar el meu agraïment a tots els companys del departament, en especial a les Unitats de Tecnologia Farmacèutica, Biofarmàcia i Farmacocinètica. Amb una citació especial de reconeixement a la Rosa M<sup>a</sup> Aparicio i Pelegrin per la seva ajuda en tot moment i la facilitat en que sempre m'ha atès per a disposar de material i primeres matèries.

Dins la complexitat que porta una memòria com aquesta, destacar les col·laboracions puntuals i tan efectives de la Dra. Anna Nardi i Ricart, Dra. Anna Fàbregas i Fernández, la Dra. Encarna Garcia i Montoya, i Roser Iñiguez i Papell.

I per acabar, i no per això menys important, donar les gràcies a tots els companys del grup, que tant m'han ajudat. Sempre recordaré les seves cares de satisfacció i entusiasme quan fèiem alguna troballa que ajudava a seguir endavant. Venen a la memòria uns noms: Cristina Cañadas Enrich, Glady's Andrés Rodríguez, Jorge Feijoo Lorden, Nelvis Velázquez Carralero, Elham Alsadat Saleh, Elena Barbolini, Joana Zamarbide Losada, Mireia Mallandrich, Berenice Andrade, Roser Sanz Casañas, Ivette Camarassa, Marta Márquez Masgrau, Cecília Callizo, Adrian Diaz Salvadores. També les companyes del Departament de Físico-Química com Elena Sánchez, Marcelle Abreu, Camila Folle sempre ben disposades.

I finalment expressar els meus agraïments a tot el personal docent i administratiu del Departament de Farmàcia, Tecnologia Farmacèutica i Físico-Química de la Facultat de Farmàcia i Ciències de l'Alimentació de la Universitat de Barcelona.

Ahora, un record per els companys de feina: la Neus, la Laura, en Gonçal, la Mireia, l'Iman, l'Abril i en Joan.

I entrelligat amb el tema d'aquesta memòria dues persones a les que dec especial agraïment com aportació remota al tema: el company farmacèutic de Barcelona Eugeni Fors i Iborra que em va introduir junt amb el meu germà Julià Suñer i Carbó, ja fa vint anys, en la formulació magistral de medicaments, autèntics farmacèutics galènics experts. No oblidaré mai les llargues tertúlies respecte tensioactius i excipients nous en formulació de medicaments.

Finalment, en aquesta missió d'agraïments, seria injust no esmentar la família. Han sofert les absències i dificultats que tota feina com aquesta porta. S'han mantingut al meu costat en els moments difícils, ja que han patit indirectament l'execució d'aquesta memòria. Tot el meu agraïment als meus pares Frederic i Anna Maria, la meua muller Irene i les meves filles Carla i Diana; i els meus germans Enric, Julià i Frederic.

Acabo, no em voldria deixar a ningú, si be ha passat molt temps, he conegut a molta gent, per si hi ha algun oblit no intencionat, a tots ells, gràcies. Si que en queda un i es un sincer agraïment a les empreses subministradores de primeres matèries: Evonik Industries, Acofarma i Gattefosé.

Joaquim Suñer i Carbó  
Juny 2017

## ***In memoriam***



A la Prof. Dra. *Coloma Barbé i Rocabert*, Professora i companya.

Aquesta memòria va dedicada a la Professora Dra. Coloma Barbé i Rocabert (*Castellar del Vallès*, 16-09-1946, *Barcelona* 17-06-2012) primera directora d'aquesta Tesis que no ha pogut veure acabada aquesta memòria. A ella dec el suggeriment del tema i consegüentment la meua introducció en el camp dels sistemes dispersos, ja fa més de vint anys. D'ella voldria ressaltar la seva capacitat docent, fruit d'uns anys d'exercici com mestre d'escola, que més tard acompanyava amb una visió encertada de la Indústria Farmacèutica. Es complia allò tan repetit de que "el bon mestre, ensenyant aprèn". Això, juntament amb la seva capacitat de concreció front un problema i en la forma de redacció tant de forma rigorosa com en pla de broma, sortien historietes il·lustrades, rimes, versos i poesies. Això acompanyat en el pla personal, d'una bonhomia en tots els aspectes, feien d'ella una persona amb qui venia de gust compartir treball i amistat. Sempre tenia un acudit simpàtic, alguna cosa per dir que animava i alegrava. Pràcticament ho solucionava tot, moltes coses pensàvem amb els companys del grup ... Això ho farà la Coloma, i ho feia!

*"Coloma, allà on estiguis, vull que sàpigues que aquesta tesis és teva.*

*La teva bona feina, com tot, s'eclipsarà però no s'extingirà.*

*Gràcies per tot el que em vas ensenyar durant tots aquests anys."*



*“Quaerite et Invenietis”*  
*Cerqueu i trobareu*  
Sant Mateu, 7,7.

*Per a la meva família*



# ÍNDEX GENERAL

---



<b>ÍNDEX GENERAL</b> .....	<b>XII</b>
<b>ABREVIATURES I SÍMBOLS</b> .....	<b>XVIII</b>
<b>RESUM</b> .....	<b>XXII</b>
<b>SUMMARY</b> .....	<b>XXIII</b>

**CAPITOL I. INTRODUCCIÓ** ..... **XXIV**

**1.1 ELS FONGS COM AGENTS INFECCIOSOS. TERÀPIA ANTIFÚNGICA**..... **1**

1.1.1 Generalitats.....	1
1.1.2 Micosis .....	3
1.1.2.1 Exemples d' infeccions micòtiques superficials i cutànies .....	9
1.1.3 Fàrmacs Antifúngics .....	14
1.1.3.1 Antecedents Històrics en el desenvolupament dels Fàrmacs Antifúngics .....	15
1.1.3.2 Classificació Fàrmacs Antifúngics.....	16
1.1.3.2.1 Antibiòtics: Polièns.....	17
1.1.3.2.2 Azols .....	18
1.1.3.2.2.1 Clotrimazol.....	19
1.1.3.2.2.2 Econazol .....	20
1.1.3.2.2.3 Bifonazol .....	20
1.1.3.2.3 Anàlegs de precursors d'àcids nucleics .....	21
1.1.3.2.4 Equinocandines .....	22
1.1.3.2.5 Al·lilamines.....	22
1.1.3.2.6 Derivats de la Morfolina: Amorolfina .....	22
1.1.3.2.7 Derivats del Benzofurà: Griseofulvina .....	23
1.1.3.2.8 Derivats de la Piridona: Ciclopirox Olamina.....	23
1.1.3.2.9 Altres compostos i Formulacions Magistrals Inespecífiques .....	23
1.1.3.3 Antifúngics Tòpics.....	25
1.1.4 Noves Estratègies per el disseny de formulacions per el tractament de la infeccions fúngiques superficials .....	26

**1.2 EMULSIONS MÚLTIPLES** ..... **29**

1.2.1 Les Emulsions Múltiples: Conceptes Bàsics.....	29
1.2.1.1 Les Emulsions com a Sistemes Dispersos .....	29
1.2.1.1.1 Estabilitat de les Emulsions.....	34
1.2.1.2 Emulsions Múltiples .....	35
1.2.1.3 Mecanismes d'inestabilització de les Emulsions Múltiples .....	39
1.2.1.4 Composició i mètodes d'obtenció.....	40
1.2.1.4.1 Principals excipients utilitzats per a Via Tòpica .....	40



1.2.1.4.2 Mètodes d'obtenció de les Emulsions Múltiples W/O/W .....	46
1.2.1.4.3 Emulsions Múltiples d'aplicació Tòpica .....	50
1.2.1.4.4 Les Emulsions Múltiples com sistemes per al disseny de micropartícules ..	53
1.2.1.4.4.1 Micropartícules: Tècniques de preparació emprant Emulsions Múltiples..	54
1.2.1.4.4.2 Aplicacions.....	55
1.2.1.4.5 Les Emulsions Múltiples en la Indústria Alimentària.....	55
1.2.1.5.4 Emulsions Múltiples en la Indústria Química: Processos de Separació a través de Membranes Líquides.....	56
<b>1.3 LA PELL. ANATOMIA, FISIOLOGIA I FUNCIONS.....</b>	<b>58</b>
<b>SISTEMES DE TRANSPORT CUTANI. ....</b>	<b>58</b>
1.3.1 Anatomia de la Pell.....	58
1.3.2 Fisiologia de la Pell.....	65
1.3.3 La Pell com via d'administració de Fàrmacs.....	66
1.3.4 Permeació Cutània .....	67
1.3.4.1 Vies de Penetració a través de la pell.....	67
1.3.4.2 Procés de Permeació Cutània.....	68
1.3.4.3 Factors que influeixen en el pas de les substàncies actives a través de la Pell ..	78
<b>CAPITOL II. OBJECTIUS I PLA DE TREBALL.....</b>	<b>81</b>
<b>2.1 OBJECTIUS I PLA DE TREBALL.....</b>	<b>83</b>
<b>CAPITOL III. RESULTATS.....</b>	<b>87</b>
<b>3.1 RESULTATS.....</b>	<b>89</b>
“DEVELOPMENT OF CLOTRIMAZOLE MULTIPLE W/O/W EMULSIONS AS VEHICLES FOR DRUG DELIVERY: EFFECTS OF ADDITIVES ON EMULSION STABILITY”.....	91
“SKIN PERMEATION OF ECONAZOLE NITRATE FORMULATED IN AN ENHANCED HYDROPHILIC MULTIPLE EMULSION” .....	111
“A NOVEL BIFONAZOLE MULTIPLE EMULSION FOR EPIDERMAL DELIVERY: INFLUENCE OF POLYSORBATE 80 UPON SKIN PENETRATION”.....	125
<b>CAPITOL IV. DISCUSSIÓ .....</b>	<b>159</b>
<b>CAPITOL V. CONCLUSIONS.....</b>	<b>181</b>
<b>CAPITOL VI. BIBLIOGRAFIA ADDICIONAL .....</b>	<b>187</b>
<b>ANNEX: ALTRES MÈRITS.....</b>	<b>207</b>

# ABREVIATURES I SÍMBOLS

---



## Abreviatures i Símbols:

%ΔBS:	<i>Backscattering</i>
AIC:	Criteri d' <i>Akaike</i>
ANOVA:	Anàlisi de la Variança
AUC:	Àrea sota la corba
BFZ:	Bifonazol
BFZ-CF:	Referència Comercial de Bifonazol
BS:	Retrodispersió ( <i>Backscattering</i> )
ca.:	Circa (prové del llatí), aproximadament
CDC:	<i>Cetyl dimethicone copolyol</i> , Abil® EM 90
CMB:	<i>Cocamidopropyl betaine</i> , Tego® Betain F
CLT:	Clotrimazol
CLT-CF	Referència Comercial de Clotrimazol
CF:	Referència Comercial
CP:	Palmitat de cetil
CV:	Coefficient de variació
DMSO:	Dimetilsulfòxid
EE:	Eficiència d'encapsulació
ECN:	Nitrat d'econazol
ECN-CF:	Referència Comercial d'econazol
EUCAST:	<i>European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing</i>
G':	Storage modulus
G'':	Loss modulus
G*:	Complex modulus
HLPC:	Cromatografia Líquida d'Alta resolució
HLB:	Balanç hidròfil-lipòfil
ICH:	<i>International Conference on Harmonisation</i>
IM:	Miristat d'isopropil
J:	Flux de permeació
K <sub>p</sub> :	Constant de Permeabilitat del fàrmac
LogP	Coefficient de repartiment (expressat en logaritme)
LOQ:	Límit de quantificació
LD:	Difracció Làser
LP:	Triglicèrids de cadena mitja ( <i>Labraphac® Lipophile WL 1349</i> )
LVR:	Regió viscoelàstica lineal (" <i>Linear viscoelastic region</i> ")
ME ('s):	Emulsió (ns) Múltiple (s) ( <i>Multiple emulsion</i> )
MIC:	Concentració mínima inhibidora
NLC's:	Vehicles lípidics nanoestructurats
η*:	Complex viscosity
O/W:	Emulsió Oli-en-aigua

O/W/O:	Emulsió múltiple Oli-en-aigua-en-oli
$\delta$ :	Angle de fase o "Phase angle"
PM:	Pes molecular
PPG:	Propilenglicol
$\gamma$ :	Esforç de cisalla o <i>Shear rate</i>
SC o SCR:	Estrat Corni
SCH:	Hidratació del estrat corni
SD:	Desviació Standard
SNL's:	Nanopartícules Sòlid-Líquid
$\tau$ :	Shear stress
TEWL:	Pèrdua d'aigua transepidermica ( <i>Transepidermal Water Loss</i> )
TGC:	<i>Tego® Carbomer ER341</i>
VE:	Epidermis viva
$\mu\text{m}$ :	micra (o micròmetre)
USP:	Farmacopea dels Estats Units
UV-Vis:	Ultravioleta visible
W/O:	Emulsió aigua-en-oli
W/O/W:	Emulsió múltiple aigua-en-oli-en-aigua
YB:	Oli de jojoba

## RESUM

---

Els tractaments de les micosis superficials i/o cutànies es realitzen bàsicament amb antifúngics d'administració tòpica, encara que alguna vegada pot ser necessari l'ús d'antifúngics sistèmics. El tractament tòpic ofereix el potencial per aconseguir concentracions altes del fàrmac en la zona afectada de la pell amb una exposició mínima a d'altres òrgans. Això pot augmentar en gran mesura l'eficàcia i també la seguretat en relació amb l'administració sistèmica. De totes formes, el tractament indicat ha de ser sempre individualitzat en funció de les característiques del pacient i de les lesions que manifesta. El vehicle d'administració per cada tipus d'infecció fúngica, s'haurà d'escollir adequadament, el que assegurarà uns resultats idonis en cada situació. Els fàrmacs antifúngics es classifiquen, entre d'altres, segons les seves propietats químiques. Els derivats azòlics (inhibidors enzim lanosterol 14- $\alpha$ -desmetilassa) constitueixen un dels grups més representatius de la terapèutica actual per al tractament de les micosis superficials i/o epidèrmiques. Entre ells trobem: clotrimazol (CLT), bifonazol (BFZ), econazol (ECN), ... Una vegada revisada la bibliografia recent en el camp dels sistemes dispersos tipus emulsions múltiples, es proposen formulacions bàsiques inèdites actualment recomanades per a l'aplicació tòpica sobre la pell. En aquestes formulacions proposades s'hi vehiculen diferents agents antifúngics de tipus azol per tal d'avaluar les característiques fisicoquímiques i, per últim, veure el grau de penetració sobre la pell i la retenció cutània dels preparats obtinguts. Donat que el primer inconvenient de les emulsions és la seva inestabilitat, el present treball pretén, en primer lloc interpretar la incidència dels components d'aquestes formulacions en la seva estabilitat en funció de les característiques físico-químiques i, en segon lloc, justificar la viabilitat pràctica de les formulacions estudiades mitjançant la penetració del fàrmac sobre la pell, el grau de permeació cutània i l'eficàcia antimicrobiana.

## SUMMARY

---

The treatments of superficial mycoses are made primarily with antifungal topical administration, although sometimes it may be necessary to use systemic antifungals. The topical treatment has the potential to achieve high concentrations of the drug in the affected area of the skin with minimal exposure to other organs. This can greatly increase the efficacy and safety in relation to systemic administration. However, the indicated treatment should always be individualized according to patient characteristics and the injuries. The administration vehicle for each type of fungal infection, must be chosen properly, to ensure satisfactory results in every situation. Antifungal drugs are classified, among others, according to their chemical properties. Azolic derivatives (lanosterol 14- $\alpha$ -demethylase inhibitor) constitute one of the most representative of the current therapies for the treatment of superficial fungal and/or epidermal infections. Among them are: clotrimazole (CLT), bifonazole (BFZ), econazole (ECN). Once reviewed the recent literature in the field of dispersed multiple emulsions systems types, basic formulations currently recommended for topical application on the skin are proposed. In these formulations proposed convey different antifungal agents, the physicochemical characteristics are evaluated and finally the skin penetration and permeation of the preparations are studied. As the first disadvantage of the emulsions is their instability, in the current work, the incidence of the components of these formulations on stability according to the physico-chemical is first studied, and secondly the practical feasibility of the formulations studied by the drug penetration, skin permeation and antimicrobial efficacy is justified.

# CAPITOL I. INTRODUCCIÓ

---





## 1.1 ELS FONGS COM AGENTS INFECCIOSOS. TERÀPIA ANTIFÚNGICA.

### 1.1.1 Generalitats

La incidència de les infeccions fúngiques superficials de la pell, cabells i ungles s'ha incrementat arreu del món en els últims anys. La prevalença d'aquestes infeccions s'ha elevat a tal nivell, que en les últimes dècades les micosis cutànies afecten a un 20-25% de la població mundial, donant lloc a una de les formes més freqüents d'infeccions (*Havlickova i cols., 2008*). En les dues últimes dècades, aquesta incidència ha crescut molt ràpidament en pacients immunodeprimits provinents d'òrgans trasplantats, quimioteràpia del càncer i pacients amb VIH (*Cao i cols., 2013*). També es veuen afectats els pacients que estan ingressats en centres hospitalaris i amb altres malalties subjacents greus als quals es realitzen diverses tècniques invasives (*Murray i cols., 2014*).

La distribució de les dermatomicosis, els seus agents etiològics i els patrons d'infecció anatòmic predominant varien segons la ubicació geogràfica i una àmplia gamma de valors ambientals i factors culturals (*Havlickova i cols., 2008*). Degut al nombre creixent de persones que viatgen per tot el món, les micosis que eren considerades geogràficament limitades, ara aquestes es poden veure en qualsevol part del món. A més, en els últims anys el nombre de fongs reconeguts com patògens humans ha crescut, causat en part, per un augment de la població afeblida i pacients immune deprimits (*Burns i cols., 2010*).

El regne *Fungi* (*Eumycota*) està format per organismes eucariotes, uni o pluricel·lulars i heteròtrofs, les estructures somàtiques, que els distingeix d'altres eucariotes, estan envoltades de parets cel·lulars rígides compostes per quitina i glucans com a components majoritaris (*Calvo, 2012*), i una membrana cel·lular en la qual l'ergosterol substitueix el colesterol com a principal component esteròlic. A diferència dels bacteris, l'estructura cel·lular dels fongs és més complexa. Són microorganismes eucariotes que posseeixen un nucli ben definit, mitocòndries, aparell de *Golgi* i reticle endoplasmàtic (*Murray i cols., 2014*). Són organismes que digereixen matèria orgànica insoluble per mitjà de la secreció d'enzims i la posterior absorció dels nutrients solubilitzats.

Es creu que els fongs van passar de ser aquàtics a terrestres fa uns 400 milions d'anys, durant el període silurià, just després de l'aparició de les primeres plantes terrestres (*Berbee i cols., 1992*). A pesar que l'ésser humà ha conviscut durant tota la seva evolució amb els fongs, i que coneix les seves propietats des de fa milers d'anys, l'estudi dels fongs es remunta únicament a fa uns 250 anys. Durant el segle XVIII, els botànics van realitzar molts avenços en el reconeixement i classificació dels bolets o macro-fongs, sent aquella època en la que els primers microscopistes van començar l'estudi de les seves estructures (*Calvo, 2012*). A principis del segle XIX es va denominar fongs microscòpics a uns organismes que causaven malalties que afectaven plantes i que presentaven estructures similars als fongs

ja coneguts (*Carlile i cols., 2001*). A l'any 1969 *Whittaker* va proposar la creació d'un nou Regne, al separar els fongs de les plantes, establint així les bases actuals de la micologia com a ciència. Fins a la data, s'han descrit aproximadament unes 100.000 espècies de fongs, encara que s'estima que el nombre total pugui assolir el milió i mig (*Hawksworth, 2001*).

La classificació dels fongs ha variat molt en els últims anys, especialment des del desenvolupament i l'aplicació en micologia de tècniques de biologia molecular. Actualment, els fongs es classifiquen en quatre grups o *Filums* (divisions): Ascomicets, Basidiomicets, Zigomicets i Quitridiomicets. El *filum* més nombrós és el Ascomicets que inclou més del 60% dels fongs coneguts i, de mitjana, el 85% dels patògens per a humans. Els altres fongs patògens són els zigomicets i basidiomicets (*Mitchell, 2010*). Al mateix temps, segons el tipus de relació amb altres organismes, els fongs poden ser sapròfits, mutualistes, comensals i paràsits. La majoria de fongs són sapròfits, ja que formen part del medi extern i es desenvolupen a partir de la matèria orgànica en descomposició. Els fongs mutualistes<sup>1</sup> viuen associats amb altres organismes en benefici recíproc. Els fongs comensals són microorganismes que viuen en una relació estreta en la qual un es beneficia de la relació i l'altre ni es beneficia ni en surt perjudicat. I per últim els fongs paràsits són microorganismes que viuen a l'exterior o a l'interior d'un hoste del qual obtenen beneficis sense fer cap contribució útil a canvi; en el cas dels patògens, la relació és perjudicial per a l'hoste.

En base a la seva morfologia, els fongs es divideixen en llevats, fongs filamentosos i fongs dimòrfics. Els llevats són fongs unicel·lulars de forma esfèrica o el·lipsoïdal, amb mida compresa entre 3 i 5 micròmetres i capaços de replicar-se de manera asexual. Dins aquest grup trobem gèneres de fongs patògens humans com *Candida* o *Cryptococcus*, així com altres de gran importància en la indústria alimentària com *Saccharomyces* (*Calvo, 2012*).

No obstant això, la gran majoria de fongs pertanyen al grup dels fongs filamentosos o floridures. Aquests són capaços de replicar-se de manera tant asexual com sexual i presenten una estructura pluricel·lular anomenada miceli que està formada per un conjunt de filaments tubulars o hifes. S'anomena miceli a la massa d'hifes entrecruades acumulada durant la fase de creixement actiu. Els fongs filamentosos posseeixen un miceli adossat o immers en el substrat i un miceli apical en el que desenvolupen les seves estructures reproductives. I per últim, els fongs dimòrfics poden presentar formes llevaduriformes o filamentoses depenent de les característiques de l'ambient (temperatura, pH, concentració de CO<sub>2</sub> ...) com per exemple *Histoplasma*, *Blastomyces* i *Coccidioides*.

---

<sup>1</sup> També anomenats simbiotes per alguns autors, en referència a microorganismes que viuen junts, de tal manera que l'associació suposa una avantatge mutu.

Alguns fongs realment milloren la qualitat de vida dels humans al contribuir a la producció d'aliments i begudes com en la maduració dels formatges i fermentadors en la producció de pa i cervesa. També s'utilitzen en el control biològic de plagues agrícoles. A més, els fongs s'utilitzen com a fonts de substàncies d'utilitat en medicina i en la bioindústria com són els antibiòtics (penicil·lines) e immunosupressors (com les ciclosporines) i els agents per estimular el desenvolupament de les plantes. No obstant això, també poden causar greus perjudicis al actuar com paràsits de plantes i animals, o contaminants d'aliments (*Mitchell, 2010*).

Encara que podem trobar centenars de milers d'espècies de fongs en l'ambient, solament unes 400 espècies causen malalties en els éssers humans i menys de 50 espècies ocasionen el 90% de les micosis humanes i en animals (*Mitchell, 2010*).

Les infeccions causades per fongs reben el nom de micosi i solen ser de curs clínic crònic (de llarga durada) ja que els fongs creixen amb lentitud.

### 1.1.2 Micosis

A més de la classificació taxonòmica dels fongs, les micosis es poden classificar segons els teixits infectats, així com les característiques específiques dels grups de microorganismes. Aquesta classificació <sup>2</sup> comprèn doncs, micosis superficials, cutànies, subcutànies, sistèmiques i oportunistes. Així doncs, depenent de la localització de la infecció, les micosis es poden classificar com:

#### Micosis superficials

Són aquelles que afecten la capa externa de l'estrat corni de la pell i la cutícula del pèl. Aquest tipus de micosi afecta teixits inerts per la qual cosa no es dona una resposta immunitària detectable en l'hoste. Entre els agents etiològics causants d'aquest tipus d'infeccions cal destacar *Malassezia spp.* (llevat causant de la pitiriasi versicolor), *Hortaea werneckii* (causant de la *Tinea* negra), *Trichosporon spp* i *Piedraia hortae* (causants de la *Piedra* blanca i negra, respectivament). *Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton rubrum*, *Epidermophyton floccosum* entre altres que poden produir onicomicosi.

El diagnòstic de les infeccions superficials és relativament senzill i la teràpia específica acostuma a proporcionar una bona resposta clínica, encara que amb certes dificultats en el cas de les infeccions de les ungles.

---

<sup>2</sup> L'agrupament de les micosis en les categories esmentades mostra la seva porta corrent d'entrada al lloc inicial d'atac. No obstant això, sorgeixen enormes solapaments o punts comuns, ja que les micosis generalitzades mostren manifestacions subcutànies i viceversa.

## Micosis cutànies

Són infeccions produïdes en general per uns fongs paràsits de la queratina<sup>3</sup> anomenats dermatòfits i que es localitzen a l'epidermis, dermis i estructures queratinitzades (ungles i pèl). Els dermatòfits<sup>4</sup> són fongs que es classifiquen en els gèneres *Trichophyton*, *Epidermophyton* i *Microsporum*. Les infeccions de la pell produïdes per aquests microorganismes es denominen dermatofitosis o tineses<sup>5,6,7,8,9</sup>. Les micosis cutànies<sup>10</sup> es diferencien de les micosis superficials en que poden afectar a capes més profundes de la pell provocant la resposta immunitària de l'hoste. A part dels dermatòfits, diverses espècies de no dermatòfits tipus *Candida*, principalment *C. albicans*, i *Aspergillus*, també es troben implicades habitualment en aquest tipus d'infeccions, afectant no només la pell sinó també les ungles i les mucoses (*Murray i cols. 2014*). Les micosis cutànies poden evolucionar cap a la producció de lesions subcutànies (*Erbagci, 2002; Smith i cols., 1991*).

Basant-se en el seu reservori natural, els dermatòfits també poden classificar-se en tres grups amb interès epidemiològic: antropofílics (l'home), zoofílics (dels animals), geofílics (del sòl), la qual cosa és d'especial interès perquè ens permet sospitar, a través de la clínica, l'origen de la infecció (Taula 1).

Tipus	Transmissió	Característiques clíniques
Antropofílics	Persona a persona	Lesions cròniques, poc o gens inflamatòries
Zoofílics	Animal a persona	Lesions agudes, inflamació intensa (vesícules i pústules)
Geofílics	Sòl a animal o persona	Lesions amb inflamació moderada

Taula 1: Classificació dels dermatòfits segons la seva transmissió (segons Puig i cols., 2008).

<sup>3</sup> Per això el dermatòfits també sels anomena fongs queratinolítics.

<sup>4</sup> La etimologia del terme dermatòfit prové del grec, "derm" significa pell i "phyte" significa planta. Tot i que els dermatòfits no estan relacionats filogenèticament amb les plantes (com es creia antigament), aquest terme en la actualitat pot considerar-se no adequat.

<sup>5</sup> Terme procedent del llatí que significa "cuc o corc".

<sup>6</sup> La OMS defineix les dermatofitosis o tineses com micosis superficials produïdes per dermatòfits, un ampli grup de fongs filamentosos constituïts per *Trichophyton*, *Epidermophyton* i *Microsporum* amb aproximadament 40 espècies.

<sup>7</sup> Les espècies més importants causants d'infecció cutània en l'ésser humà a Espanya són el *Trichophyton rubrum* (43%), el *Trichophyton mentagrophytes* (21,2%), *Microsporum canis* (9,8%), *Microsporum gypseum* i *Epidermophyton floccosum*. Mentre que al peu en concret trobem, per ordre de freqüència, *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Epidermophyton floccosum* i més en nens el *T. tonsurans*. Tot i que la prevalença de les diferents espècies de dermatòfits varia segons àrees geogràfiques (*Monzón i cols., 2003*).

<sup>8</sup> També conegudes com *Tineas*, dermatofícies, epidermofícies, epidermofitosis.

<sup>9</sup> Les dermatofitosis es solen descriure clínicament amb la paraula amb llatí "tinea" seguit de la zona del cos afectada.

<sup>10</sup> Les infeccions fúngiques superficials es defineixen com infeccions en què l'agent causal esta restringit l' estrat corni. A vegades les infeccions superficials i cutànies es contemplen com infeccions fúngiques superficials (*Schwartz, 2004*).

A nivell més pràctic i clínic, tal com s'ha dit, les dermatofitosis es classifiquen fonamentalment segons la seva topografia, de manera que es divideixen en:

- *Tinea pedis* (peus)
- *Tinea cruris* (ingles)
- *Tinea capitis* ( cuir cabellut)
- *Tinea corporis* (cos)
- *Tinea unguium* (ungles)
- *Tinea manuum* (mans)
- *Tinea barbae* (barba)

Els altres agents causals que conformen les dermatofitosis són la *Candida* i els bacteris. La *Candida* és un llevat de la qual hi ha més de 150 espècies, però la causa més comuna de candidiasis superficial és la *Candida albicans*, i representa el 85-90% de les infeccions per fongs llevaduriformes. Es troba sovint colonitzant les mucoses, aïllant-se en l'orofaringe el 60% d'individus sans. Altres espècies aïllades com patògens de lesions cutànies i mucoses menys freqüents són *C. parapsilopsis*, *C. tropicalis*, *C. guilliermondii*, etc. El desenvolupament d'infecció provocada per espècies de *Candida* depèn de la interacció entre el fong i els mecanismes de defensa del subjecte infectat. Entre els factors que predisposen a infeccions per candidiasis es troben la *diabetis mellitus*, la maceració, l'excés de sudoració, l'ús de corticoides i d'antibiòtics d'ampli espectre, etc... Depenent de la zona afectada, hi ha diferents formes de presentació, però en general són les zones dels plecs i les mucoses les més afectades, ja que les condicions d'humitat i maceració afavoreixen el creixement dels llevats. Això inclou tant els grans plecs (engonals, Intergluti, axil·lars, submamaris) com els petits, com ara els interdigitals de les mans (erosió interdigital blastomicètica) i dels peus.

I per últim, els bacteris també poden acompanyar aquestes dermatofitosis. Normalment són estafilococs o estreptococs, encara que en pacients diabètics podem trobar amb més freqüència bacteris gram negatius com la *Pseudomona*. L'infecció concomitant de bacteris i dermatòfits rep el nom de "infecció complexa o complicada" (*Puig i cols., 2008*).

### Micosis subcutànies

Són infeccions cròniques, localitzades sota la pell i del teixit subcutani arran de la implantació traumàtica de l'agent etiològic. Els fongs causants d'aquest tipus d'infeccions conformen un grup molt heterogeni, generalment sapròfits del sòl, la capacitat dels quals per adaptar-se als teixits i provocar la malaltia és molt variable.

Afecten les capes profundes de la dermis i teixit cel·lular subcutani, i es poden estendre cap al múscul i als ossos. Segons el microorganisme causant, podem distingir diversos tipus de micosis subcutànies, entre les quals podem destacar (*Mariné, 2010*):

- Eumicetoma. Es tracta de lesions granulomatoses supuratives, l'exsudat de les quals acostuma a presentar microcolònies en forma de grans. Els agents causals inclouen els gèneres *Madurella*, *Acremonium*, *Pseudallescheria*, *Exophiala*, *Leptosphaeria*, *Curvularia*, *Fusarium* i *Neoscytalidium* entre d'altres.
- Esporotricosi. És provocada per membres del complex d'espècies *Sporothrix schenckii*. La forma més típica de la malaltia és l' esporotricosi limfocutània aguda i es produeix per la disseminació de l'organisme cap als ganglis limfàtics propers al punt on es produeix la inoculació traumàtica. (Morris-Jones, 2002).
- Cromoblastomicosi. Aquesta infecció es caracteritza per la presència de lesions ulceroses no exsudants, poc extenses i localitzades preferentment a les extremitats. Poden disseminar-se per via limfàtica. Els agents responsables típics de la cromoblastomicosi són: *Cladophialophora carrioni*, *Fonsecaea spp.*, *Phialophora verrucosa* i *Exophiala dermatitidis*.
- Feohifomicosi. Infecció crònica localitzada en la dermis profunda i teixit subcutani, Causada per un agent causal que presenta una morfologia micel·lar en teixit. Els agents etiològics són diferents espècies d'*Exophiala*, *Phialophora*, *Wangiella*, *Bipolaris*, *Exserohilum*, *Cladophialophora*, *Aureobasidium*, *Cladosporium*, *Curvularia* i *Alternaria*.

### Micosis sistèmiques

Les micosis sistèmiques<sup>11</sup> impliquen la disseminació de la infecció a dos o més òrgans no adjacents o a un òrgan i a la sang (Rubio i cols., 2001, Mitchell, 2010). Són les més greus i poden resultar fatals per als individus amb un sistema immunitari deficient o quan el patògen és resistent als tractaments antifúngics. El diagnòstic i tractament de les micosis sistèmiques correspon a l'àmbit hospitalari (Caballero i cols., 2005). Aquestes infeccions fúngiques generalment són adquirides a partir de la inhalació o inoculació traumàtica d'espores. Tot i que són molt més freqüents en pacients immunocompromesos, també es poden donar en pacients amb el sistema immunitari aparentment intacte. En pacients immunocompetents aquestes infeccions acostumen a ser causades pels fongs dimòrfics; patògens capaços de superar les defenses fisiològiques i cel·lulars de l'hoste humà normal per mitjà de canvis importants en la seva paret cel·lular, morfologia i metabolisme. Per la seva incidència i gravetat en podem destacar les següents espècies: *Histoplasma capsulatum*, *Blastomyces dermatitidis*, *Paracoccidioides brasiliensis* i *Coccidioides immitis*. Totes aquestes espècies, en general, es troben geogràficament limitades a les zones àrides d'Amèrica i acostumen a

---

<sup>11</sup> Les micosis sistèmiques sovint s'anomenen micosis endèmiques perquè aquests microorganismes són veritables patògens i poden produir infeccions en persones sanes.

produir després de la inhalació, una infecció pulmonar inicial amb disseminació posterior a altres òrgans i teixits (Mariné, 2010).

### Micosis oportunistes

Les micosis oportunistes són infeccions que es poden atribuir a fongs que es troben normalment com comensals humans o al medi ambient. A excepció de *Cryptococcus neoformans* i *Cryptococcus gattii*, aquests microorganismes tenen una virulència inherentment baixa o limitada i produeixen infecció en persones que estan afeblides o immune deprimides o que tenen dispositius protètics implantats o catèters intravasculars. Pràcticament tots els fongs poden actuar com a patògens oportunistes, i cada any augmenta la llista dels que s'han identificat. Tots aquests factors permeten a fongs que normalment serien incapaços de causar infeccions en un hoste sa, produir greus infeccions sistèmiques. Els patògens micòtics oportunistes més freqüents són els llevats del gènere *Candida* i *Cryptococcus neoformans*, floridures del gènere *Aspergillus* i *Pneumocystis jirovecii* (Murray i cols., 2014) (veure taula 2).



Micosis superficials	Micosis cutànies i subcutànies	Micosis sistèmiques o endèmiques	Micosis oportunistes
Piedra Negra <i>Piedraia hortae</i>	Dermatofitosis Gènere <i>Microsporum</i> Gènere <i>Trichophyton</i> Gènere <i>Epidermophyton</i>	Blastomicosis <i>Blastomyces dermatitidis</i>	Aspergilosis <i>Aspergillus fumigatus</i> ; <i>A. flavus</i> ; <i>A. niger</i> ; <i>A. terreus</i>
Tinea negra <i>Hortae werneckii</i>	Tiña ungueal Gènere <i>Trichophyton</i> Gènere <i>Epidermophyton</i>	Histoplasmosis <i>Histoplasma capsulatum</i>	Candidiasis <i>Candida albicans</i> ; <i>C. glabrata</i> ; <i>C. Parapsilosis</i> ; <i>C. tropicalis</i>
Pitiriasis versicolor <i>Malassezia furfur</i>	Onicomicosis Gènere <i>Candida</i> Gènere <i>Aspergillus</i> Gènere <i>Trichosporon</i> Gènere <i>Geotrichum</i>	Coccidioidomicosis <i>Coccidioides immitis/posadasii</i>	Criptococosis <i>Cryptococcus neoformans</i>
Piedra blanca Gènere <i>Trichosporon</i>	Queratitis micòtica Gènere <i>Fusarium</i> Gènere <i>Aspergillus</i> Gènere <i>Candida</i>	Peniciliosis <i>Penicillium marneffeii</i>	Tricosporonosis Gènere <i>Trichosporon</i>
	Cromoblastomicosis Gènere <i>Fonsecaea</i> Gènere <i>Phialophora</i>	Paracoccidioidomicosis <i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	Hialohifomicosis Gènere <i>Acremonium</i> Gènere <i>Fusarium</i> Gènere <i>Paecilomyces</i> Gènere <i>Scedosporium</i>
			Mucormicosis Gènere <i>Rhizopus</i> Gènere <i>Mucor</i> <i>Lichtheimia corymbifera</i>
			Feohifomicosis Gènere <i>Alternaria</i> Gènere <i>Curvularia</i> Gènere <i>Bipolaris</i> Gènere <i>Wangiella</i>
			Neumocistosis: <i>Pneumocystis jirovecii</i>

Taula 2: Classificació de les micosis humanes i agents causals més representatius (segons Murray i cols., 2014).

1.1.2.1 Exemples d' infeccions micòtiques superficials i cutànies



Figura 1: *Tinea facial* (imatge cedida per Dr. Jaume Notario Rosa, Servei de Dermatologia, Hospital Universitari de Bellvitge, Hospitalet de Llobregat, Barcelona).



Figura 2: *Tinea capitis* (imatge cedida per Dr. Jaume Notario Rosa, Servei de Dermatologia, Hospital Universitari de Bellvitge, Hospitalet de Llobregat, Barcelona).

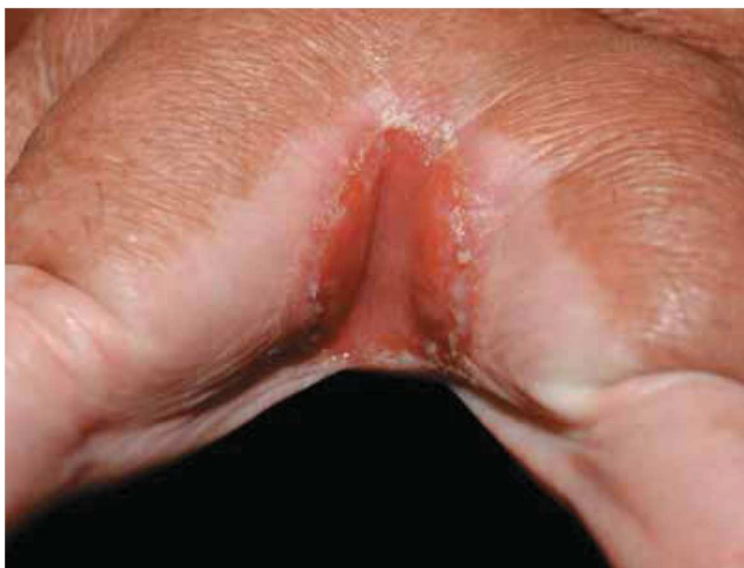


Figura 3: Candidosi cutània (intertrigo interdigital) (segons *Wolff i cols., 2014*).



Figura 4: Candidosi: dermatitis del bolquer (segons *Wolff i cols., 2014*).



Figura 5: *Tinea anular* corporal en cuixa (segons *Wolff i cols.*, 2014).



Figura 6: *Tinea manuum* (imatge cedida per Dr. Jaume Notario Rosa, Servei de Dermatologia, *Hospital Universitari de Bellvitge, Hospitalet de Llobregat, Barcelona*).



Figura 7: *Tinea interdigitalis* del peu (segons Wolff i cols., 2014).



Figura 8: *Tinea pedis* per *Trichophyton rubrum* (imatge cedida per Dr. Jaume Notario Rosa, Servei de Dermatologia, Hospital Universitari de Bellvitge, Hospitalet de Llobregat, Barcelona).



Figura 9: *Tinea corporis* (imatge cedida per Dr. Jaume Notario Rosa, Servei de Dermatologia, Hospital Universitari de Bellvitge, Hospitalet de Llobregat, Barcelona).



Figura 10: *Tinea corporis* (imatge cedida per Dr. Jaume Notario Rosa, Servei de Dermatologia, Hospital Universitari de Bellvitge, Hospitalet de Llobregat, Barcelona).

### 1.1.3 Fàrmacs Antifúngics

El terme antifúngic o antimicòtic inclou aquelles substàncies que poden produir modificacions a les estructures bàsiques de la cèl·lula fúngica, inhibint el seu desenvolupament o alterant la seva viabilitat i produint les mínimes alteracions possibles en les cèl·lules de l'hoste (*Kerridge i cols., 1990*).

En tots els antifúngics, són molt importants el seu espectre d'activitat i el seu mecanisme d'acció: Els fàrmacs que són fungicides (com els derivats poliènics, terbinafina, ciclopiroxolamina i amorolfina) provoquen la mort del fong tant *in vivo* com *in vitro* per mecanismes directes sobre aquest i solen ser més eficaços en la eradicació de la infecció, escurçant el temps de tractament, que els fungistàtics (majoria azols a concentracions habituals, naftifina, griseofulvina), que impedeixen la replicació però no impliquen la seva exterminació directa. D'aquesta manera, els fàrmacs fungicides presenten l'avantatge de permetre posologies i durades de tractament més curtes i senzilles que milloren el compliment (*Puig i cols., 2008*).

La lipofília és una altra característica de certs antifúngics (al·lilamines, azols, ciclopiroxolamina i amorolfina) especialment important perquè afavoreix la penetració del fàrmac en l'estrat corni de la pell, la seva dispersió i la creació d'un efecte reservori a concentracions inhibidores en aquesta capa, convertint-los en fàrmacs particularment indicats per al tractament tòpic cutani (*Puig i cols., 2008*).

En l'actualitat s'està produint un augment en el consum d'aquests fàrmacs a Espanya, que ha passat de 8 milions d'unitats a l'any 1992 fins a 10,8 milions el 2000, representant un 65% del consum total d'antifúngics<sup>12</sup>. Això representa un 52,4% de la despesa total en antifúngics (*Cervera i cols., 2001*). Els autors del treball conclouen que el consum d'antifúngics és creixent i major en el medi extra hospitalari. Es recomana insistir en l'ús correcte d'aquests antimicrobians i fomentar campanyes informatives entre els prescriptors menys familiaritzats amb el seu maneig, sobretot metges de medicina general, pediatres, podòlegs, etc., per així optimitzar la seva utilització.

Actualment existeixen un ampli ventall de preparacions antifúngiques tòpiques per al tractament de les micosis cutànies i mucoses. Es comercialitzen preparacions tòpiques de gairebé totes les classes d'antifúngics, com els polièns (p. ex., amfotericina B, nistatina, pimaricina), les al·lilamines (p. ex., naftifina i terbinafina) i nombrosos imidazols i altres

---

<sup>12</sup> A Espanya dins dels antifúngics tòpics, el més consumit és ketoconazol amb un 27%, seguit per clotrimazol i miconazol, amb un 17% i un 14%, respectivament. En aquest mercat, dominat pels azols, es pot observar en els últims anys un descens en el consum de sertaconazol, flutrimazol i ketoconazol, en benefici d'un altre tipus de antifúngics com ciclopirox, que aconsegueix en l'actualitat un 4,9%. Altres tipus d'antifúngics tòpics es consumeixen en menor proporció, com terbinafina (2,1%), nistatina (1,4%), amorolfina (1,3%) i naftifina (1,3%) (*Cervera i cols., 2001*).

fàrmacs pertanyents a altres grups. Es disposa de cremes, locions, pomades, pólvores i solucions per al tractament de les micosis cutànies i la onicomicosi, mentre que les infeccions mucoses es tracten millor amb suspensions, comprimits, pastilles o supositoris (*Murray i cols, 2014*).

L'elecció d'un tractament tòpic o sistèmic davant una micosi cutània o de la mucosa sol dependre de l'estat del pacient i del tipus i l'extensió de la infecció. La majoria de les infeccions cutànies per dermatòfits i la candidiasi bucal o vaginal responen al tractament tòpic, mentre que la naturalesa resistent d'altres entitats, com la onicomicosi o la *Tinea* del cuir cabellut, sol necessitar d'un tractament sistèmic perllongat a llarg termini (*Murray i cols, 2014*).

### 1.1.3.1 Antecedents Històrics en el desenvolupament dels Fàrmacs Antifúngics

Als anys 1950 la única alternativa al tractament d'infeccions fúngiques superficials eren medicaments de naturalesa recalcitrant i havia una necessitat alta de trobar antibiòtics antifúngics sistèmics. Els tractaments existents eren irritants, tòxics i al·lèrgics. La naturalesa de les substàncies terapèutiques que s'utilitzaven eren fenol, formalina, quitrà, permanganat de potassi, compostos de mercuri, sulfat de coure, àcid salicílic, glicolat de coure, sofre, àcid undecilènic, salicilanilida, violeta de genciana, nitrat de plata i solució de *Castellani*, entre d'altres (*Taplin, 1976*). Alguns preparats d'aquest tipus encara tenen certa vigència en la terapèutica actual.

La situació als 1950 mostra el significatiu progrés que s'ha dut a terme en la actualitat en el tractament de les micosis superficials. El primer treball de l'activitat antifúngica d'un compost azol (bencimidazol) va ser el 1944 per *Woolley*, que estava estudiant la deficiència de biotina en els animals i microbis. Ell observà la similitud estructural del bencimidazol amb la biotina i purines, però els efectes biològics del bencimidazol no van ser revertits per la biotina, mentre que van ser contrarestats per les purines adenina i guanina (*Woolley, 1944*). Atès que les malalties micòtiques eren d'un mínim interès el 1944, el descobriment inicial de *Woolley* va ser ignorat en gran mesura, encara que les seves dades van ser confirmades en 1949 per *Goldsworthy i cols*. Trenta anys més tard, *Vanden Bossche* va observar que fenetilimidazol (azol amb activitat antifúngica), interferia en la membrana cel·lular de *Candida spp.* (*Vanden Bossche i cols., 1974*). En 1952, *Jerchel i cols* van seguir amb el treball de *Woolley* i van informar que certs derivats de bencimidazol tenien activitat antifúngica significativa. Aquesta publicació va encoratjar altres investigadors a la recerca d'un agent antifúngic clínicament útil. L'avanç va arribar al 1958 i al 1959, quan el clormidazol, (1-clor-bencilimidazol), va ser desenvolupat i estudiat en assajos clínics (*Herrling i cols., 1959; Seeliger i cols., 1958*). De fet el clormidazol va ser en la forma d'una crema tòpica al 5%, el primer derivat azol desenvolupat i comercialitzat com un fàrmac antifúngic. Amb la



introducció de clormidazol, l'interès en l'activitat antifúngica dels compostos d'azol va començar a augmentar. Per exemple, després de la introducció de tiabendazol, el 1961 per *Merck Sharp & Dohme* (MSD) (per al seu ús com un fàrmac antihelmíntic d'ampli espectre), *Robinson i cols.* (1964) assajaren el compost per a l'activitat antifúngica *in vitro*. Va ser eficaç contra dermatòfits i moltes espècies d'*Aspergillus*, però la seva activitat contra llevats va ser mínima. De la mateixa manera, *Janssen Pharmaceutica* (Beerse, Bèlgica) el 1973 va desenvolupar el mebendazol com un agent antihelmíntic d'ampli espectre que va demostrar tenir activitat antifúngica (*Brugmans i cols.*, 1971). Malgrat el fet que l'activitat antifúngica d'aquests dos compostos no era el perseguit, les dades van recolzar el concepte que dos compostos azol tenien potencial com a fàrmacs antifúngics per a ús humà. A la fi de 1960, i a partir de dos laboratoris diferents, tres compostos es van introduir en la literatura científica. Es van introduir en dos mesos de diferència: clotrimazol, desenvolupat per *Bayer AG* (*Wuppertal, Alemanya*), i miconazole i econazol, desenvolupat per *Janssen Pharmaceutica*. En concret el Prof. *Karl Heinz Büchel* de Bayer<sup>13</sup> va tenir èxit en la síntesi del primer derivat d'un azol, clotrimazol<sup>14</sup>, a finals de 1960 (<http://www.canesten.com/en/history/index.php>). Aquests tres imidazols es segueixen utilitzant avui en dia per al tractament d'infeccions fúngiques, demostrant l'èxit d'aquests primers descobriments.

És a dir, els antifúngics azols van ser desenvolupats durant els anys 50 i 60 i no es van emprar en la pràctica clínica fins al 1969, malgrat que la primera molècula d'aquest tipus, el bencimidazol, va ser descrita el 1944. Els primers representants del grup van ser el clotrimazol, el miconazol i l'econazol, als quals van seguir altres com el ketoconazol, el fluconazol i itraconazol. Posteriorment han aparegut el voriconazol, el posaconazol, i el ravuconazol. La naftifina va ser introduïda a la pràctica clínica el 1985 i la terbinafina el 1991.

#### 1.1.3.2 Classificació Fàrmacs Antifúngics

Els antifúngics es poden classificar segons la seva estructura química, el seu origen (natural o de síntesi química), el seu espectre (ampli o restringit), i el seu mecanisme d'acció (membrana cel·lular, paret fúngica, ARN)<sup>15</sup>. A la Figura 11 es pot observar com es poden

---

<sup>13</sup> Bayer® crea un laboratori d'investigació de micologia mèdica l'any 1963.

<sup>14</sup> El clotrimazol es va registrar a Alemanya per primera vegada el 1973 i llançat al mercat sota la marca Canesten®. Les primeres presentacions per al tractament de les infeccions micòtiques de la pell eren la crema i la solució (spray), mentre que Canesten® comprimits vaginals van ser desenvolupats per al tractament de les infeccions fúngiques vaginals. Al final dels anys 1970, la gamma es va ampliar amb l'addició de la solució Canesten® amb atomitzador i crema vaginal Canesten®. Gràcies a la seva excel·lent eficàcia i tolerabilitat, els productes dermatològics Canesten® es van registrar per a l'automedicació en 1977. Les presentacions ginecològiques per a 1 dia i 3 dies de teràpia es van concedir inicialment com preparats OTC ("Over-the-Counter"), disponible sense prescripció, a Anglaterra el 1992, i dos anys més tard a Alemanya. Canesten® ja està disponible sense prescripció mèdica en la gran majoria dels països.

<sup>15</sup> Altres autors classifiquen els fàrmacs antifúngics segons la seva activitat local o sistèmica. La majoria d'autors utilitzen aquesta classificació perquè els sembla de major utilitat clínica.

classificar els fàrmacs antifúngics segons el seu mecanisme d'acció i a la Taula 3 una breu classificació dels fàrmacs antifúngics segons la naturalesa química.

Entre tots els fàrmacs existents, alguns tenen activitat exclusivament tòpica i altres per via oral o ambdues, el que és especialment important per a la seva prescripció.

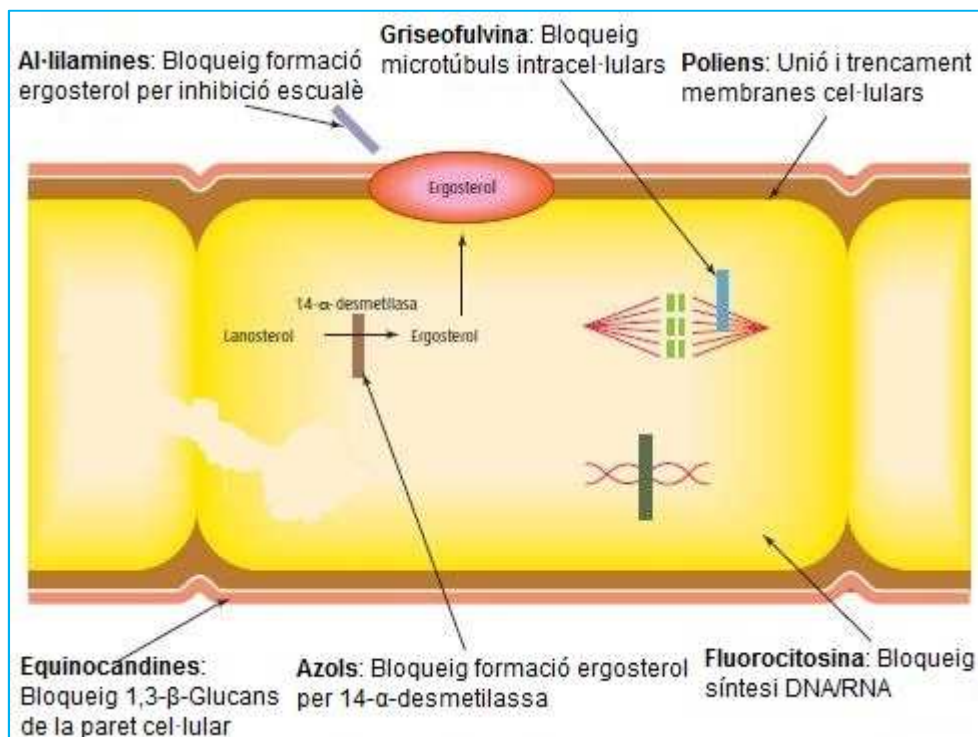


Figura 11: Mecanisme d'acció dels principals fàrmacs antifúngics (segons *Bonifaz, 2012*).

Així doncs també, segons l'estructura química els fàrmacs antifúngics es poden dividir en:

#### 1.1.3.2.1 Antibiòtics: Poliens

Els poliens són substàncies antibiòtiques sintetitzades per actinomicets del gènere *Streptomyces*, i van ser els primers antifúngics que es van desenvolupar. Se'n coneixen més de 100 compostos diferents, dels quals el més important és l'amfotericina B i la nistatina. L'amfotericina B es va obtenir a partir de *Streptomyces nodosus* i va ser comercialitzada per al seu ús clínic l'any 1958. Tot i ser el compost de referència per al tractament de les micosis sistèmiques, la seva administració provoca nefrotoxicitat al 80% dels pacients. La membrana cel·lular dels fongs té una estructura semblant a la membrana de les cèl·lules animals, de la qual es diferencia per la presència de l'ergosterol en comptes del colesterol. L'activitat antifúngica dels poliens es basa en la unió irreversible a l'ergosterol, això provoca la formació de petits canals que permeten la sortida de petites molècules de l'interior de la cèl·lula fúngica i l'entrada d'altres substàncies. La seva acció requereix només alguns minuts per alterar l'equilibri osmòtic de la cèl·lula fúngica i provocar-li la mort.

La nistatina també és un antibiòtic antimicòtic produït per *Streptomyces noursei*. Igual que la amfotericina B te estructura poliènica i posseeix acció fungistàtica i fungicida. Tot i que cobreix varies espècies de fongs, el fet que no es pugui administrar via sistèmica, degut a la seva toxicitat, obliga a restringir la seva acció terapèutica a les infeccions cutànea-mucoses produïdes per diferents espècies de *Candida* en la boca, esòfag i vagina (*Mediavilla i cols., 2014*).

#### 1.1.3.2.2 Azols

**Característiques:** Els azols constitueixen una de les famílies d'antifúngics més nombrosa. La seva estructura química es basa en anells heteropentacíclics amb dos (imidazols) o tres (triazols) àtoms de nitrogen units per àtoms d'hidrogen a altres anells aromàtics.

**Mecanisme d'acció:** Els azols són antifúngics que actuen inhibint l'activitat del citocrom P450 del fong (també anomenat lanosterol 14-alfa-desmetilassa). Aquest enzim catalitza l'eliminació del grup 14-metilè (C-32) del lanosterol en el pas a ergosterol (compost essencial de la membrana cel·lular dels fongs que regula la seva fluïdesa i permeabilitat, així com l'activitat dels enzims units a ella), inhibint així la síntesi de la membrana cel·lular del fong. El problema principal que presenten es que no discriminen entre el citocrom P-450 de la cèl·lula fúngica i el de la cèl·lula dels animals, lo que explica la majoria d'efectes secundaris e interaccions medicamentoses. Depenent del microorganisme i l'azol administrat, la inhibició de la síntesi d'ergosterol comporta la inhibició de la proliferació de la cèl·lula fúngica (fungistàtic) o bé la mort cel·lular (fungicida) (*Murray i cols, 2014*). Aquest sistema enzimàtic és present en un gran nombre de tipus d'éssers vius i la seva funció és la síntesi d'ergosterol (fongs) o colesterol (animals).

En l'actualitat l'ús dels imidazols es limita al tractament de les micosis superficials, essent els més utilitzats<sup>16</sup>: clotrimazol, econazol, bifonazol, miconazol, flutrimazol, tioconazol, sertaconazol, eberconazol, sulconazol, terconazol, butaconazol, oxiconazol, omoconazol i fenticonazol entre d'altres. Els triazols són molècules amb un ampli espectre d'acció, presenten una menor toxicitat i són més estables metabòlicament que els imidazols. Estan indicats en el tractament de les micosis tant superficials com sistèmiques. Els representants principals d'aquest grup són el fluconazol<sup>17</sup>, itraconazol, voriconazol, i posaconazol.

Juntament amb les al·lilamines, en l'actualitat els azols són els fàrmacs d'elecció per quasi tots els tipus de micosis. Es troben disponibles amb un ampli ventall de formes galèniques com cremes, pólvores, gels, solucions, òvuls, etc., essent fàrmacs molt segurs amb escassa

---

<sup>16</sup> Els exemples que es donen són descrits en la bibliografia científica actual però no impliquen la presència comercial al nostre país.

<sup>17</sup> El fluconazol és l'antifúngic de primera elecció en el tractament de les candidis recurrents orofaríngees i genitals que donen mala resposta a tractaments tòpics, així també com micosis subcutànies i sistèmiques greus.

absorció percutània (*Caballero i cols., 2005*). A continuació es detallen les principals característiques dels grup d'azols més representatius en la terapèutica actual antifúngica d'aplicació tòpica.

El treball experimental realitzat en aquesta memòria ha donat lloc a la preparació de diferents formulacions que han utilitzat aquest grup altament representatiu de la terapèutica tòpica actual antifúngica.

#### 1.1.3.2.2.1 Clotrimazol

**Característiques físico-químiques:** Forma molecular:  $C_{22}H_{17}ClN_2$ ; PM=344,84 g/mol (*Peschka i cols, 2007*); pKa= 6,02 (*Avdeef i cols, 2007*); log P=5,44 (*Betanzos i cols, 2015*); Solubilitat: 3,7 µg/ml. Pólvora cristal·lina, blanca o groguenca pàl·lida. Pràcticament insoluble en aigua, soluble en etanol al 96% i en clorur de metilè. Punt de fusió: 141-145 °C (*Peschka i cols, 2007*).

El Clotrimazol va ser el primer antifúngic imidazol comercialitzat. Va ser sintetitzat el 1969 per els químics de Bayer AG, tot i que la síntesi no va ser reportat fins a 1972 (*Buchel i cols., 1972*). El Clotrimazol té ben establerta la seva activitat *in vitro* contra soques de dermatòfits, llevats patògens i fongs filamentosos i dimòrfics, així com alguns bacteris gram-positius. El medicament és útil en el tractament d'infeccions per dermatòfits, infeccions fúngiques superficials, és a dir, *Tinea versicolor*, i diverses infeccions per *Candida*, incloent candidiasi oral i la candidiasi vaginal. Tot i el seu excel·lent espectre d'acció, la seva administració oral està totalment contraindicada. Per la seva eficàcia, el clotrimazol s'ha utilitzat com a referència en molts assaigs clínics dels derivats azòlics més nous. El clotrimazol és útil en la *Tinea versicolor*, candidiasis cutànies i mucoses. La curació clínica requereix 2-4 setmanes d'aplicació tòpica, depenent del lloc i de la extensió de la infecció. Actualment també s'utilitza en la *Tinea* del peu. Les reaccions adverses consisteixen en eritema, coïssor, formació de butllofes i despreniment de la pell, edema, pruija i urticària. Per via vaginal pot produir irritació local (*Mediavilla i cols., 2014*).

La seva seguretat per via tòpica és acceptable quan s'empra en forma de crema, solució o pólvora al 1%, crema vaginal al 2% i comprimits vaginals 100 i 500 mg (100 mg/durant 3 dies o 500 mg/1 dia). La posologia tòpica en forma de crema, solució o pols requereix 2 administracions durant 4 setmanes. En la *Tinea* del peu aconsegueix taxes de curació del 82% a pacients tractats durant 4 setmanes amb solució al 1%. El seu major inconvenient és que requereix tractaments tòpics prolongats de 4 setmanes per aconseguir taxes de curació semblants a altres antifúngics tòpics.

Les presentacions comercials al nostre país són: crema al 1%, crema vaginal al 2% i 10%, solució al 1%, pólvores al 1% i tablettes vaginals de 100 mg i 500 mg.

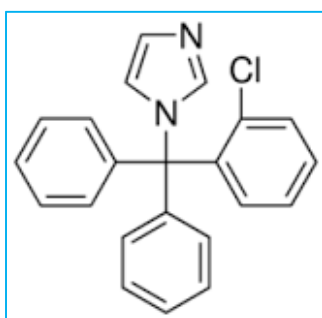


Figura 12: Formula química Clotrimazol.

#### 1.1.3.2.2.2 Econazol

**Característiques fisicoquímiques:** Forma molecular:  $C_{18}H_{16}Cl_3N_3O_4$ ; PM=444,70 g/mol; pKa=6,29 (*Shalaeva i cols, 2008*). Solubilitat: 1,48  $\mu\text{g/ml}$ . Polvora microcristal·lina blanca, pràcticament inodora. Punt de fusió: 162  $^{\circ}\text{C}$ .

L'econazol és un derivat d'imidazol antifúngic que té una estructura idèntica a la del miconazol amb l'absència d'un àtom de clor en un anell de benzè. Va ser sintetitzat per *Janssen Pharmaceutica* en 1969 (*Godefroi i cols., 1969*). L'econazol és aplicable al tractament de la dermatofitosi: *Tinea* dels peus, inguinal, *Tinea* del cos, pitiriasi versicolor i candidiasis superficials cutànies. No és útil en la tinea del cuir cabellut. Les tonyes corporals i inguinals requereixen dues setmanes de tractament, i la *Tinea* dels peus fins a 4 setmanes. Pot produir reaccions locals. S'aplica en forma de crema.

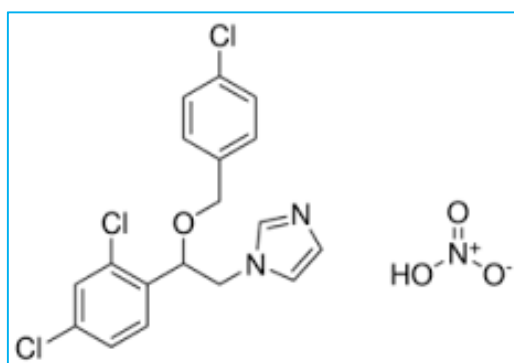


Figura 13: Formula química nitrat d'econazol.

La presentació comercial al nostre país és una crema al 1%.

#### 1.1.3.2.2.3 Bifonazol

**Característiques fisicoquímiques:** Forma molecular:  $C_{22}H_{18}N_2$ ; PM= 310,39 g/mol (*Yokomizo, 1996*); pKa= 5,72 (*Popovic i cols, 2003*); log P=3,01 (*Yokomizo, 1996*).

Solubilitat: 0,13 µg/ml. Polvora cristal·lina, blanca o quasi blanca. Pràcticament insoluble en aigua, bastant soluble en etanol anhidra. Punt de fusió: 142 °C.

Bifonazol és un agent antifúngic imidazol lliure d'halògens, sintetitzat i desenvolupat per Bayer AG (*Berg i cols., 1987; Plempel i cols., 1987*). Bifonazol té un ampli espectre *in vitro*, incloent molts llevats patògens, fongs dimòrfics, dermatòfits, l'agent de la *Tinea versicolor*, i diversos fongs filamentosos. La droga és molt lipòfila i insoluble en aigua i el que li atorga una bona disponibilitat, un elevat temps de retenció cutània i una bona tolerància, i per tant el fan molt efectiu per a la via tòpica. S'utilitza al 1% amb una aplicació diària local durant 2-4 setmanes. Pot produir reaccions irritants locals i hipersensibilitat a l'alcohol cetoestearílic com excipient utilitzat. S'aplica en forma de crema, solució i pólvores.

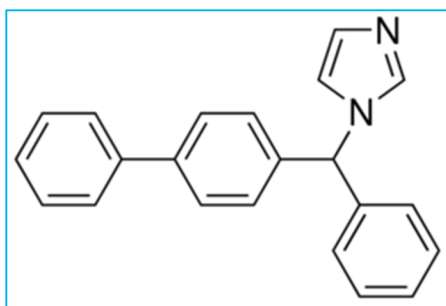


Figura 14: Formula química bifonazol.

Està disponible al mercat en forma de crema, gel, solució i pólvores de bifonazol al 1% i també formulat amb urea (per a onicomicosi). S'aplica 1 vegada al dia, preferentment a la nit i es recomana una durada del tractament de mínim tres setmanes en les dermatofitosis. Els efectes secundaris més habituals són irritació local (eritema i prurit)<sup>18</sup>.

La presentació comercial al nostre país és una crema al 1%.

#### 1.1.3.2.3 Anàlegs de precursors d'àcids nucleics

Són substàncies d'estructura similar a la citosina. El compost més representatiu d'aquest reduït grup d'antifúngics és la flucitosina. Es tracta d'un anàleg fluorat de la pirimidina que exerceix la seva activitat antifúngica en interferir en la síntesi de l'àcid desoxiribonucleic (ADN), l'àcid ribonucleic (ARN) i les proteïnes en la cèl·lula fúngica.

<sup>18</sup> La presència de alcohol cetoestearílic utilitzat com excipient pot donar reaccions locals irritatives d'hipersensibilitat (*Mediavilla i cols., 2014*).

#### 1.1.3.2.4 Equinocandines

Les equinocandines constitueixen una nova classe molt selectiva de polipèptids cíclics que inhibeixen la síntesi de 1,3- $\beta$ -glucans, uns importants components de la paret cel·lular del fong per mitjà de la inhibició de l'enzim (1,3)-D-glucà sintasa. Aquest enzim no es troba a les cèl·lules animals, això fa de les equinocandines un grup de fàrmacs amb una toxicitat molt reduïda. Tot i que són actives envers *Candida* i *Aspergillus*, pràcticament no tenen cap efecte sobre *Cryptococcus neoformans*, *Fusarium* i els mucorals, i la seva activitat sobre els fongs dimòrfics és també qüestionable. Els representants principals d'aquest grup d'antifúngics són: Caspofungina, Micafungina, Anidulafungina que s'administren per via intravenosa.

#### 1.1.3.2.5 Al·lilamines

**Característiques:** Són compostos altament lipofílics i un nou grup de antimicòtics d'ampli espectre el qual pertanyen la terbinafina i la naftifina, el primer per ús tòpic o per via oral i el segon exclusivament d'ús per via tòpica.

**Mecanisme d'acció:** L'acció antifúngica d'aquestes substàncies ve donada pel bloqueig de la ruta biosintètica de l'ergosterol per la inhibició de l'esqualè-epoxidasa (enzim essencial en la via de síntesi d'ergosterol), un enzim que no depèn del citocrom P-450. El seu efecte fungicida és degut en part a la reducció del contingut de l'ergosterol de la membrana cel·lular i l'acumulació d'esqualè a l'espai plasmàtic.

##### Terbinafina

És el representant més important de les al·lilamines, introduït al mercat l'any 1991. És actiu tant per via tòpica com oral. Com a conseqüència de la seva naturalesa altament lipofílica, es distribueix favorablement en teixits com ara la pell, ungles i teixit adipós amb la qual cosa el seu ús terapèutic es dirigeix principalment al tractament de les dermatomycosis, però té poca eficàcia enfront *Candida* i *Malassezia* (Caballero i cols., 2005). És actiu tant per via tòpica al 1% com oral i està disponible en càpsules, crema, aerosol, gel i solució per el tractament de la *Tinea corporis*, *cruris*, *pedis* i *unguium*.

##### Naftifina

Un altre exemple també d'aquesta família és la naftifina, una al·lilamina solament útil via tòpica, efectiva davant els dermatòfits i llevats amb un potent efecte antiinflamatori (que no presenta la terbinafina) i poc eficaç enfront *Candida* i *Malassezia*. El principi actiu està molt ben tolerat però s'ha observat irritació local al 3% de pacients tractats. Està disponible en forma de crema i gel al 1%.

#### 1.1.3.2.6 Derivats de la Morfolina: Amorolfina

**Característiques:** Compostos amb activitat fungistàtica i fungicida.

**Mecanisme d'acció:** Actuen bloquejant la producció d'ergosterol e inhibint l'enzim 14-alfa-reductassa i la 7-delta-8-isomerassa. El principal representant d'aquest grup és la amorolfina. És un derivat de la morfolina amb un ampli espectre d'acció via tòpica enfront dermatòfits i *Candida* entre d'altres. Bàsicament és un antifúngic que vehiculitzat en forma de laca al 5% és efectiu per al tractament de la onicomicosi. Es comercialitza en forma de laca d'ungles.

#### 1.1.3.2.7 Derivats del Benzofurà: Griseofulvina

La griseofulvina va ser el primer antifúngic oral (1958) utilitzat per al tractament de les dermatofitosis. És un antibiòtic natural produït per varies espècies de *Penicillium*. El seu espectre d'acció està restringit a dermatòfits ja que li manca d'activitat enfront altres fongs patògens (*Candida* i *Malassezia*). La seva acció és fungistàtica a l'interrompre la metafase de la divisió cel·lular. El seus efectes secundaris són nombrosos i variats. S'administra únicament per via oral en forma de comprimits i solucions. En l'actualitat sols està recomanat en les tnyes del cap i també en processos dermatofítics pediàtrics que necessiten tractament sistèmic (*Caballero i cols., 2005*).

#### 1.1.3.2.8 Derivats de la Piridona: Ciclopirox Olamina

Ciclopirox olamina pertany a la família de les hidroxipiridones amb un ampli espectre d'acció que engloba dermatòfits, fongs dimòrfics, llevats, bacteries, actinomicets, micoplasmes, clamídies i tricomones. El seu mecanisme d'acció està relacionat amb la permeabilitat de la membrana cel·lular del fong, inhibint la seva activitat respiratòria a concentracions elevades. La seva elevada capacitat de penetració en les capes cornificades supera a la d'alguns imidazols com l'econazol, clotrimazol i miconazol, amb valors en epidermis entre els 100 i 200 µg/cm<sup>3</sup> (*Puig i cols., 2008*). Aquest grau de penetració en les estructures còrnies fa que s'utilitzi en el tractament tòpic de les onicomicosis en forma de laca (*Caballero i cols., 2005*). Es comercialitza en forma de crema, solució, gel i laca d'ungles al 8%. S'aplica durant 2-4 setmanes com a mínim, dos cops al dia.

#### 1.1.3.2.9 Altres compostos i Formulacions Magistrals Inespecífiques

El clioquinol és una 8-hidroxiquinolona relacionada amb el iodequinol, solament és per aplicació tòpica doncs la seva administració sistèmica pot produir neuropatia mieloòptica subaguda. S'absorbeix a través de la pell fins al 40% i es pot utilitzar per *Tinea pedis*, i pot provocar reaccions irritatives i d'hipersensibilització.

El Tolnaftat és un tiocarbamat que s'utilitza en *Tinea pedis* i *Tinea versicolor*, però no serveix per altres localitzacions de tnyes ni candidiasis (*Mediavilla i cols, 2014*). Està disponible a la concentració al 1% com crema, gel, pólvores i solució, amb aplicació dos cops al dia.



### Formulacions Magistrals Inespecífiques:

No s'ha d'oblidar que es disposen de preparats amb propietats antifúngiques inespecífiques i que es poden utilitzar com coadyuvants, sobretot en les micosis cutànies inflamatòries o amb exsudació. Les més utilitzades són les solucions de permanganat de potassi al 1/10000 (el més potent), el sulfat de zinc al 1/1000 i el sulfat de coure al 1/1000. A continuació es mostra un recull de les principals preparacions magistrals que existeixen (*Caballero i cols., 2005; Puig i cols., 2008; Katz, 2000; Bennet, 2011*):

- Derivats del iode: Tintura de Iode, Alcohol Iodat, solució iode-iodurada han estat molt utilitzats però tenen escassa eficàcia.
- Solució de violeta de genciana al 1%-15%, útil en candidiasi de mucoses però molt antiestètica per l'intens color.
- Solució de permanganat de potassi a concentració de 1:10.000.
- Sulfat de cinc al 1:1000
- Sulfat de coure al 1:1000
- Solució de blau de metilè al 1%, també molt antiestètica pel color
- *Tintura de Castellani*, constituïda per àcid bòric, fenol, resorcina, acetona, alcohol, fucsina. Té també acció bactericida i s'utilitza en micosis localitzades en els plecs. També és antiestètica pel color i pot resultar irritant.
- *Pomada de Whitfield*, constituïda per àcid salicílic, àcid benzoic i vaselina. S'utilitza en dermatofícies i sobretot en "*Querion de Celso*" (*Bennet, 2011*).
- Solució de hiposulfit sòdic al 20%, molt utilitzat en pitiriasi versicolor.
- Sulfur de seleni, eficaç en la pitiriasi versicolor, però desagradable quant a la seva aplicació i mala olor.
- Àcid undecilènic, també utilitzat en la pitiriasi versicolor (*Bennet, 2011*).
- Propilenglicol, és un queratolític amb propietats antifúngiques, s'ha utilitzat en les onicomicosis en solució a parts iguals amb urea i àcid làctic.
- *Pomada de Drew*
- Propionat de sodi
- Quinoleina halogenada
- Undecilat de cinc
- Clorur d'alumini
- Àcid salicílic

Famílies	Substàncies principals
Poliens	Amfotericina B (v.o.), Nistatina (v. Tòpica)
Azols (imidazols)	Clotrimazol, Econazol, Bifonazol, Miconazol, Ketoconazol (via oral i tòpica), Tioconazol, Sertaconazol, Flutrimazol, Eberconazol, Fenticonazol, Omoconazol, Sulconazol, Oxiconazol, Terconazol, Butaconazol
Azols (triazols) –via oral	Fluconazol (v.o.), Itraconazol (v.o.), Voriconazol (v.o.), Posaconazol (v.o.)
Anàlegs precursors àcids nucleics	5-fluorocitosina
Equinocandines	Caspofungina, Micafungina, Anidulafungina (v.i.)
Precursors àcids nucleics	Flucitosina
Al·lilamines	Terbinafina (v. Tòpica i v.o.) Naftifina (v. Tòpica)
Derivats de la morfolina	Amorolfina (v. Tòpica)
Derivats del benzofurà	Griseofulvina (v.o.)
Altres antifúngics	Clioquinol Tolnaftat
Preparats antifúngics inespecífics: (Antisèptics o desinfectants tòpics)	Tintura de iode, Pomada de <i>Whitfield</i> , Permanganat de potassi, Pomada de <i>Drew</i> , propionat de sodi, undecilat de cinc, Tintura de <i>Castellani</i> , Violeta de Genciana, quinoleïna halogenada, sulfat de coure, sulfat de cinc, blau de metilè, Hiposulfit de sodi, sulfur de seleni, PPG, àcid undecilènic, clorur d'alumini, àcid salicílic.

Taula 3: Classificació de les substàncies antifúngiques segons naturalesa química.

### 1.1.3.3 Antifúngics Tòpics

El tractament tòpic de les infeccions fúngiques és útil en els casos de lesions limitades, superficials i situacions com embaràs, lactància o interaccions amb altres fàrmacs orals. El tractament tòpic es pot utilitzar com a suport del tractament oral i com a profilaxi, un cop hagi acabat aquest, per tal d'evitar les recidives (*Molina de Diego, 2011*).

Actualment es disposa de fàrmacs antifúngics de gran eficàcia que ens permeten arribar als objectius de curació i control amb relativa comoditat per al pacient. En el nostre medi, la teràpia tòpica és efectiva i suficient en la majoria de casos. Els antifúngics tòpics representen

el 16% del total dels productes dermatològics i el 65% de tots els antifúngics (*Caballero i cols., 2005*).

Els antifúngics tòpics resulten d'interès en el tractament de les dermatofitosis. Han d'anar acompanyats, o no, de tractament sistèmic, depenent de la localització, l'extensió, la gravetat i l'etiologia de l'afecció. Alguns d'aquests mateixos fàrmacs poden usar-se també per via sistèmica. En general, les micosis superficials amb poca afectació inflamatòria responen suficientment al tractament tòpic. No obstant això, les onicomicosis, les candidiasis i moltes de les tnyes requereixen, a més, un tractament sistèmic. De qualsevol manera, l'eficàcia d'aquests preparats depèn, en bona part, de la durada del tractament, sent recomanable no interrompre'l fins després de 2-4 setmanes, segons els casos. Els antifúngics tòpics de major potència són de tipus azol, concretament imidazols. Juntament amb aquests antimicòtics relativament específics, hi ha antisèptics amb demostrada activitat antifúngica que poden constituir alternatives eficaces als productes descrits anteriorment com per exemple les fórmules magistrals inespecífiques (veure apartat 1.1.3.2.9).

#### 1.1.4 Noves Estratègies per el disseny de formulacions per el tractament de la infeccions fúngiques superficials

A mesura que passa el temps, la necessitat de desenvolupar nous medicaments i formulacions augmenta (*Bseiso i cols., 2015*). Els sistemes convencionals, incloent cremes, pomades i gels són els vehicles que tradicionalment s'utilitzen per al tractament d'infeccions fúngiques de la pell, fins i tot, si estan localitzades més profundament. Els nous sistemes d'alliberació que actualment estan en línia d'investigació tenen la capacitat de millorar l'alliberament del fàrmac en comparació a les formulacions convencionals. A més, estan especialment adaptats a millorar la penetració dels fàrmacs antifúngics, el que porta a un tractament més eficaç de les infeccions fúngiques de la pell, especialment les més profundes. Aquests sistemes de transport estan dissenyats per reemplaçar lentament els sistemes convencionals a mesura que més preparacions estiguin disponibles. D'altra banda, han de proporcionar concentracions de fàrmac adequades en les capes diana de la pell per assegurar l'eficàcia del tractament tòpic. Per tant, l'alliberació dels principis actius antifúngics per arribar a una regió concreta de la pell és avui dia un gran desafiament en termes d'aspecte terapèutic. En aquest context, la formulació d'aquests productes juga un paper clau per a la penetració dels fàrmacs a través de la pell. A més, les propietats fisicoquímiques de les molècules dels fàrmacs antifúngics que, en general, són compostos altament lipòfils, poden millorar la penetració dels fàrmacs a través d'estrat corni i l'eficàcia del producte. En els últims anys, han sorgit diverses guies de formulació estratègica per optimitzar els nous vehicles d'administració de fàrmacs antifúngics i, en certa mesura s'estan publicant algunes dades prometedores (*Gungor i cols., 2013*).

Molt vehicles nous s'estan desenvolupant en els últims anys (tal com reflexa les nombroses publicacions científiques al respecte), per la vehiculització de diferents fàrmacs antifúngics. Dintres de les nombroses publicacions esmentades, podríem classificar els principals vehicles com (*Gungor i cols., 2013; Bseiso i cols., 2015*):

- Transportadors col·loïdals (Microemulsions, Micel·les i Nanoemulsions)
- Sistemes d'alliberació Vesicular (Liposomes, Niosomes, Transferosomes i Etosomes) i Promotors d'absorció Vesiculars
- Transportadors de nanopartícules: Nanopartícules Lipídiques Sòlides (SNL's) i Vehicles Lipídics Nanoestructurats (NLC's)

A continuació a la Taula 4 es repassen les principals línies d'investigació actuals com a vehicles alternatius d'administració tòpica per millorar la penetració de fàrmacs antifúngics en la pell.

<b>Fàrmac</b>	<b>Vehicle</b>	<b>Referència Bibliogràfica</b>
Clotrimazol	Solució micel·lar SLN NLC Etosomes Transferosomes Microemulsions Nanoemulsions	<i>Bachhav i cols., 2011</i> <i>Hashem i cols., 2011</i> <i>Maheshwari i cols., 2012</i> <i>Souto i cols., 2004</i> <i>Das i cols., 2012</i> <i>Kumari i cols., 2016</i> <i>Borhade i cols., 2012</i>
Econazol	Solució Micel·lar Nanosponges NLC, SLN Liposomes Etosomes Nanoemulsions	<i>Bachhav i cols., 2011</i> <i>Piemi i cols., 1999</i> <i>Schaller i cols., 1999</i> <i>Keshri i cols., 2012</i> <i>Sanna i cols., 2007</i> <i>Passerini i cols., 2009</i> <i>Verma i cols., 2012</i> <i>Sharma i cols., 2011</i>
Miconazol	SLN Liposomes Nanoliposomes Microemulsions Transferosomes	<i>Piemi i cols., 1999</i> <i>Jain i cols., 2010</i> <i>Peira i cols., 2008</i> <i>Elmoslemany i cols., 2012</i> <i>Logu i cols., 1997</i> <i>Bhalekar i cols., 2009</i> <i>Pandit i cols., 2014</i>
Itraconazol	SLN Microemulsions	<i>Mukherjee i cols., 2009</i> <i>Chudasama i cols., 2011</i>
Voriconazol	Transferosomes Microemulsions	<i>El-Hadidy i cols., 2012</i> <i>Song i cols., 2012</i>
Ketoconazol	Liposomes Microemulsions Niosomes	<i>Logu i cols., 1997</i> <i>Patel i cols., 2009b, 2011</i> <i>Shirdsand i cols., 2012</i>
Fluconazol	Solució micel·lar SLN NLC Liposomes Niosomes Etosomes Microemulsions	<i>Bachhav i cols., 2011</i> <i>Salerno i cols., 2010</i> <i>Patel i cols., 2009a</i> <i>Jadhav i cols., 2009</i> <i>El Laithy i cols., 2002</i> <i>Schwarz i cols., 2011</i> <i>Gupta i cols., 2010, 2011</i> <i>Bhalaria i cols., 2009</i> <i>Gupta i cols., 2012</i>
Terbinafina	SLN Chitosan gel Liposomes	<i>Chen i cols., 2012</i> <i>Vaghasiya i cols., 2013</i> <i>Ozcan i cols., 2009</i> <i>Sudhakar i cols., 2014</i>
Naftifina	Microemulsions Niosomes gel	<i>Erdal i cols., 2011</i> <i>Barakat i cols., 2009</i>
Butenafina	Microemulsió base organogel	<i>Zhao i cols., 2006</i>
Sertaconazol	Microemulsió base organogel	<i>Sahoo i cols., 2014a,b</i>
Ciclopirox olamina	Niosomes Liposomes	<i>Shaikh i cols., 2010</i> <i>Verma i cols., 2010</i>
Nystatin	Nanoemulsions	<i>Fernández-Campos, 2013</i>
Amfotericina B	Microemulsió Transferosomes	<i>Butani i cols., 2014</i> <i>Devi i cols., 2011</i>

Taula 4: Principals fàrmacs, vehicles antifúngics i línies d'investigació actuals.

## 1.2 EMULSIONS MÚLTIPLES

Les emulsions múltiples són sistemes dispersos d'una elevada complexitat tant des del punt de vista de la formulació degut a la dificultat que presenta l'estabilització del sistema, com des del punt de vista de l'estudi de l'alliberament de les substàncies actives que es poden incloure en les diferents fases que les integren.

Tot i així, aquestes "emulsions d'emulsions" constitueixen un camp de recerca de gran rellevància en l'actualitat, degut a l'extens camp d'aplicació que se'ls preveu en diferents àmbits de la indústria farmacèutica, cosmètica i química.

No cal dir que en ser tan diverses les possibilitats d'ús, ho seran en major mesura els components, que s'hauran de seleccionar en funció de cadascuna de les aplicacions concretes.

Per aquesta raó, l'apartat que es presenta, després de reflectir breument les característiques de formació i estabilització de les emulsions "simples" i múltiples, i les principals aplicacions d'aquestes últimes, es centra exclusivament en l'estudi més detallat de les aplicacions de les emulsions múltiples per a l'aplicació tòpica, i en la part experimental d'aquesta memòria es concreta amb formulacions inèdites d'aplicació tòpica per al tractament de infeccions fúngiques superficials de la pell.

### 1.2.1 Les Emulsions Múltiples: Conceptes Bàsics

Per abordar l'estudi de les emulsions múltiples, cal recordar d'entrada els trets bàsics de la formació i estabilització de les emulsions simples i/o clàssiques W/O i O/W.

#### 1.2.1.1 Les Emulsions com a Sistemes Dispersos

En general es pot parlar de sistema dispers o dispersió quan existeixen dos o més fases, i estant subdividides alguna d'elles en partícules discretes (*Heusch i cols., 2002*). Una emulsió és un sistema dispers heterogeni format bàsicament per dues substàncies líquides immiscibles estabilitzades per un sistema emulgent (*Becher i cols., 1972*). En una emulsió, un líquid està dispers en el si d'un altre en forma de petites gotetes constituint la fase interna o dispersa<sup>19</sup>. L'altra fase que envolta aquestes partícules s'anomena fase externa o contínua<sup>20</sup>. La mida de gota de les emulsions sol ser de l'ordre de micres, són termodinàmicament inestables i per això es requereix aplicar energia per a la seva formació.

Les emulsions es poden classificar segons diversos criteris (*Becher i cols., 1972*). Segons la naturalesa de la fase dispersa es coneixen dos tipus d'emulsions:

<sup>19</sup> Fase interna, dispersa o discontinua

<sup>20</sup> Fase externa, dispersant o contínua

- emulsions en oli (W/O), la fase dispersa és aquosa i la fase continua oliosa.
- emulsions en aigua (O/W), la fase dispersa és oliosa i la fase contínua aquosa.

Així doncs, en la nomenclatura clàssica i/o habitual, la fase externa és la que s'indica al darrera de la barra.

Segons el volum de fase dispersa les emulsions també es classifiquen en:

- Diluïdes: el volum de fase dispersa és igual o inferior al 20% i el seu comportament reològic és newtonià.
- Concentrades: el volum de fase dispersa està entre 20-74% i el seu comportament reològic és no newtonià.
- Altament concentrades: són emulsions en les que el volum de fase dispersa és igual o superior al 74% i els seu comportament reològic és viscoelàstic.

Les emulsions són termodinàmicament inestables i per això es requereix aplicar energia per a la seva formació. L'obtenció d'emulsions del tipus W/O i O/W depèn de diversos factors. Per exemple, si una de les dues fases està en una proporció molt alta hauria de constituir en principi la fase externa. Tot i així, si per aconseguir la divisió de la fase interna en el si de l'externa només s'ha emprat energia mecànica, les fases es separaran ràpidament. Per afavorir la formació i estabilització de les emulsions resulta de gran importància la presència de tensioactiu(s)<sup>21</sup> que són molècules amfifíliques<sup>22</sup> que presenten una part hidròfoba<sup>23</sup> (o apolar) i una part hidròfila<sup>24</sup> (o polar). Per tant ho podríem definir com una entitat dual polar-apolar. Aquestes molècules consten d'un grup polar com per exemple alcohols, àcids, sulfats, sulfonats, fosfats, amines, amides, etc. El grup apolar o poc polar generalment és una cadena hidrocarbonada alquídica o benzilalquídica. La part polar té afinitat pels solvents polars com l'aigua i s'anomena generalment la part hidròfila o hidrofílica. Pel contrari el grup apolar s'anomena la part hidròfoba i hidrofòbica i també lipofílica. La part hidrofòbica és una cadena hidrocarbonada lineal (i a vegades ramificada) mentre que la part hidrofílica és un grup iònic o fortament polar (Fig.15).

Aquestes molècules disminueixen la tensió interfacial i, per tant, l'energia requerida per al procés d'emulsificació, i confereixen estabilitat a les gotes de fase dispersa respecte a la

---

<sup>21</sup> El terme tensioactiu fa referència també al terme Surfactant, agent de tensió superficial. La paraula surfactant ve de l'anglès que vol dir "Surface Active Agent". El terme emulgent fa referència a una propietat dels tensioactius que es fan servir per preparar emulsions.

<sup>22</sup> La paraula amfifíliques prové de dos arrels gregues, i el prefixe "amfi" significa "doble", del dos costats "alrededor" i per altra banda l'arrel "filo" significa "afinitat".

<sup>23</sup> Hidròfoba, lipòfila, apolar fan referència al mateix terme.

<sup>24</sup> Hidròfila, hidrofílica, polar fan referència al mateix terme.

coalescència. Els tensioactius, segons el cas, també poden actuar com agents emulgents, solubilitzants, humectants, detergents, espumants i dispersants.

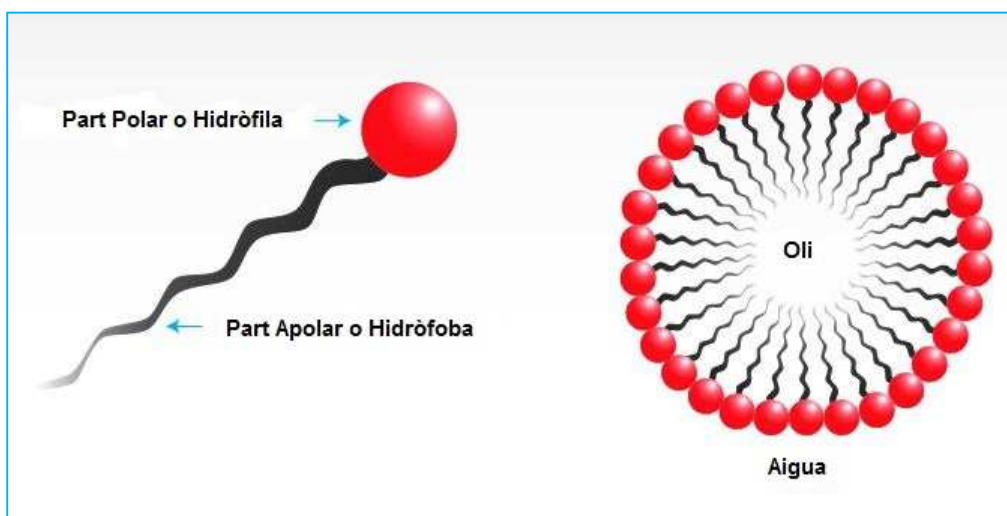


Figura 15: Representació esquemàtica bàsica d'una molècula tensioactiva amb la regió apolar, o lipòfila i la regió polar o hidròfila.

Aquestes substàncies amfifíliques posseeixen la característica de modificar les interaccions interfacials mitjançant la promoció de fenòmens d'adsorció. Aquests són coneguts com agents de superfície o tensioactius. Així doncs, tots els tensioactius són compostos amfifílics, però no tots els compostos amfifílics es poden considerar tensioactius, com l'alcohol etílic, que és un component amfifílic però no és un tensioactiu ja que no té cap activitat interfacial.

Les molècules tensioactives poden classificar-se segons l'estructura molecular. D'aquesta manera els tensioactius es poden classificar en:

- Catiònics
- Aniónics
- Anfotèrics
- No iònics
- Altres

#### Regla de Bancroft

*Bancroft* el 1913 va ser el primer investigador que va comprendre que l'estructura d'una emulsió, obtinguda mitjançant un tensioactiu, depèn en gran mesura de la naturalesa d'aquest tensioactiu. *Bancroft* va establir una regla empírica (sense donar més explicacions) establint que el líquid en el qual la solubilitat del tensioactiu és major actua com fase contínua



de l'emulsió. És a dir, la *Regla de Bancroft* mostra com la formació i l'estabilitat de les emulsions estan estretament relacionades amb l'elecció de l'agent emulsionant.

### Balanç HLB

Segons el balanç hidròfil-lipòfil o HLB ("*Hydrophilic-Lipophylic Balance*"), terme introduït per *Griffin* el 1949, els tensioactius amb valors alts d'HLB formen emulsions O/W i els tensioactius amb valors baixos d'HLB formen emulsions W/O.

El valor de HLB que se li assigna a un tensioactiu va directament relacionat amb la solubilitat que té el tensioactiu. Un valor baix de HLB significa alta solubilitat en solvents apolars (tensioactius hidròfobs o lipofílics), mentre que valors alts de HLB impliquen solubilitat en solvents polars (tensioactius hidròfils). Per formar una emulsió del tipus oli en aigua (O/W) s'utilitza un tensioactiu que sigui soluble en aigua, és a dir d'alt HLB mentre que per formar una emulsió d'aigua en oli (W/O) es fa servir un tensioactiu soluble en oli, és a dir de HLB baix. A grans trets una correlació general entre HLB i l'ús del tensioactiu es pot veure a la Taula 5.

HLB	Ús
4-6	Tensioactius per W/O
7-9	Agents humectants
8-18	Tensioactius per O/W
13-15	Detergents
10-18	Solubilitzants

Taula 5: Correlació existent entre el HLB requerit i els usos per als diferents tipus d'emulsions (segons *Griffin, 1954*).

En funció de la naturalesa dels emulgents, l'estabilització de l'emulsió s'aconsegueix per diferents causes:

- Per disminució de la tensió interfacial entre la fase aquosa i l'oli: és el cas dels tensioactius. Els tensioactius aconseguen la formació d'una pel·lícula monomolecular i flexible al voltant de les gotetes de la fase interna. Recentment, s'ha demostrat que en emulsions O/W estabilitzades mitjançant emulgents no iònics, la presència d'estructures laminars en la fase contínua contribueix decisivament a estabilitzar la pel·lícula monomolecular d'emulgent, situada a la interfase.

- Augmentant la viscositat d'una de les fases: és el cas dels col·loïdes hidròfils naturals, com les gomes aràbiga i de tragacanta, i sintètics com la metilcel·lulosa, que en ser substàncies hidròfiles, es dispersen o s'inflen en l'aigua formant solucions col·loïdals, que es pot considerar que constitueixen pel·lícules multimoleculares al voltant de les gotetes.
- Acció doble, tant sobre la tensió interfacial com sobre la viscositat. És el cas dels emulgents no iònics.

Dintre de les substàncies que s'usen com a adjuvants per a viscositzar la fase aquosa i aconseguir així l'estabilització del sistema, cal esmentar també altres productes de síntesi, com és el cas dels polímers de l'àcid acrílic (Carbomer, Carbopol®). Els polímers acrílics adquireixen la màxima viscositat, i per tant la major efectivitat, a pH propers a la neutralitat. Algunes substàncies actuen a la vegada sobre la tensió interfacial i sobre la viscositat. Com exemple es poden esmentar alguns tensioactius no iònics en excés en emulsions O/W, com és el cas de l'alcohol cetoestearílic. També cal esmentar que alguns sòlids finament dividits s'adsorbeixen a la interfase i actuen com a emulgents, en combinació amb els tensioactius sintètics i/o macromoleculares que incrementen la viscositat. És el cas de les argiles col·loïdals com la bentonita, el silicat d'alumini col·loïdal i els silicats d'alumini i de magnesi col·loïdals, entre d'altres. La mida de les seves partícules és molt petita en relació amb la de les gotes de la fase interna i formen una barrera mecànica que dificulta la coalescència.

Tot i així, cal recordar que si bé és fonamental per a obtenir una emulsió estable que estigui òptimament formulada, no és suficient aquesta condició. A tall d'exemple suposem l'elaboració d'una emulsió O/W mitjançant emulgents no iònics. Per bé que el sistema emulgent orienti adequadament a emulsió O/W (emulgent d'HLB alt) i que aquest HLB coincideixi amb el requerit per la fase oliosa, diversos factors com la temperatura a que s'han escalfat les fases, la velocitat d'agitació en incorporar-les, la ubicació dels emulgents en la fase prèvia a la mescla, la velocitat d'agitació en el procés de refredament i el temps de refredament en emulsions espessides, entre d'altres, poden dur a l'obtenció d'emulsions de característiques diferents. Efectivament es poden obtenir emulsions més o menys polidisperses, de diferents característiques reològiques i per tant de diferent estabilitat.

Així doncs, cal remarcar que per a obtenir emulsions que presentin sempre les mateixes característiques, s'ha de treballar en idèntiques condicions. Per això és indispensable garantir la qualitat de les primeres matèries i treballar segons un protocol preestablert on s'indiqui detalladament l'utilatge a emprar i el mètode d'elaboració.

#### 1.2.1.1.1 Estabilitat de les Emulsions

L'estabilitat de les emulsions depèn de la naturalesa i concentració dels seus components, així com, el mètode de preparació entre d'altres. Tot i que les emulsions són sistemes termodinàmicament inestables, poden permanèixer estables des de pocs segons fins a anys, ja que poden presentar estabilitat cinètica (*Becher i cols., 1983*).

L'estabilitat de les emulsions la confereix essencialment l'agent emulsionant (generalment tensioactiu), que modifica les propietats de la interfase aigua/oli dificultant el contacte entre les gotetes emulsionades. També influeixen entre d'altres factors la naturalesa i concentració dels tots els components així com el mètode d'elaboració. En les emulsions ben elaborades, els glòbuls de la fase interna són monodispersos d'una mida que varia, segons l'emulsió, de 0.5 a 50 µm en general.

La inestabilitat de les emulsions es manifesta essencialment en els fenòmens de sedimentació o cremat, maduració d'*Ostwald*, floculació i coalescència. Aquests mecanismes poden actuar individualment o conjuntament.

- **Cremat i sedimentació:** El cremat i la sedimentació consisteixen en l'apropament de les gotícules de la fase interna degut bàsicament a la diferència de densitats entre la fase dispersant i la dispersa (Fig. 16). Aquests agrupaments es poden dipositar tant a la superfície com al fons dels recipient que conté l'emulsió. Quan l'apropament és a la superfície parlem de cremat i quan és al fons del recipient parlem de sedimentació. La coalescència és produïda quan les gotes en contacte es fusionen entre elles formant gotes de gran mida. El cremat és un fenomen reversible ja que agitant es pot tornar homogeneïtzar l'emulsió. En canvi, la coalescència és un fenomen irreversible ja que indica la ruptura de l'emulsió, que en el seu estat més avançat portarà a la completa separació de fases. L'estabilitat de les emulsions ha de permetre que el seu aspecte macroscòpic es mantingui invariable al llarg de la conservació. Excepcionalment, segons la densitat de les fases, pot aparèixer un lleuger cremat o una lleu sedimentació: en aquests casos les emulsions han de recuperar el seu aspecte inicial per agitació normal.
- **Maduració d'*Ostwald*:** La maduració d'*Ostwald* ("*Ostwald Ripening*") es deu a la difusió de la fase dispersa des de les gotes més petites fins a les més grans, el que provoca que les gotes petites disminueixen la grandària i les més grans l'augmentin. Aquest procés es una conseqüència de la diferent pressió de *Laplace* de les gotes de diferent grandària i és un mecanisme irreversible (*Taylor, 1995, 1998; Tadros 2009*).
- **Floculació:** La floculació es degut a l'associació de gotes formant agregats degut a les Forces atractives de *Vander Waals* entre les gotes. Aquesta agregació manté les gotes

amb la seva pròpia identitat, es a dir, no hi ha ruptura del film interfacial. Dependent de la intensitat de les Forces de *Vander Waals* la floculació pot ser reversible o irreversible.

- **Coalescència:** Mitjançant aquest procés les gotes de l'emulsió es fusionen entre elles per formar gotes de mida més gran. És un mecanisme de desestabilització irreversible com ja s'ha dit. El cremat és reversible ja que es pot restablir l'homogeneïtat de l'emulsió agitant. La coalescència és irreversible, i indica la ruptura de l'emulsió, que en el seu estat més avançat portarà a la completa separació de fases.

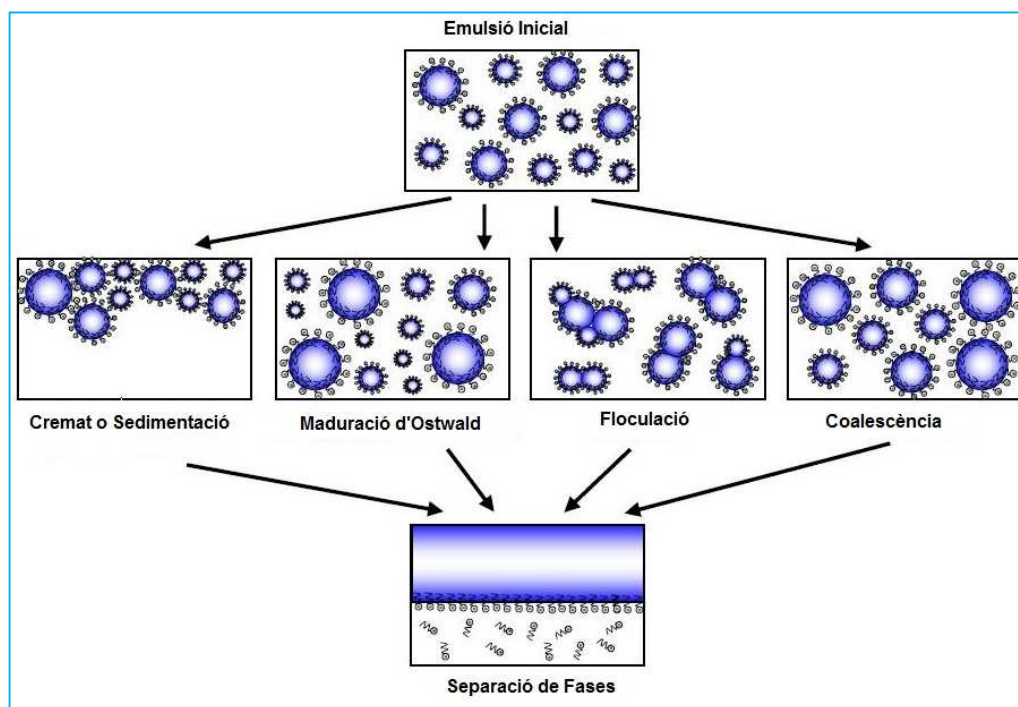


Figura 16: Tipus de fenòmens d'inestabilitat de les emulsions (esquema segons *Morral, 2011*).

### 1.2.1.2 Emulsions Múltiples

Una emulsió múltiple és bàsicament la dispersió d'una emulsió en una tercera fase. Les emulsions múltiples són sistemes complexos que la majoria d'autors defineixen com una emulsió en una emulsió, és a dir, un sistema dispers en el que coexisteixen dos tipus d'emulsions. En aquests sistemes les gotes de la fase dispersa contenen a la seva vegada gotetes dispersades més petites. Això significa que existeixen dos tipus d'emulsions: emulsions O/W/O (oli-en-aigua-en-oli) on les partícules aquoses disperses en la fase oliosa contenen a més a més petites gotetes d'oli, i emulsions W/O/W (aigua-en-oli-en-aigua) on les partícules olives disperses en la fase aquosa contenen a més a més petites gotetes d'aigua (Fig. 17). En la nomenclatura habitual, les emulsions simples reben el nom d'emulsions de primer ordre, ja que posseeixen una sola interfase, mentre que les emulsions

múltiples es consideren de segon ordre ja que posseeixen dues interfases. És possible obtenir emulsions de tercer, quart i cinquè ordre i fins i tot més.

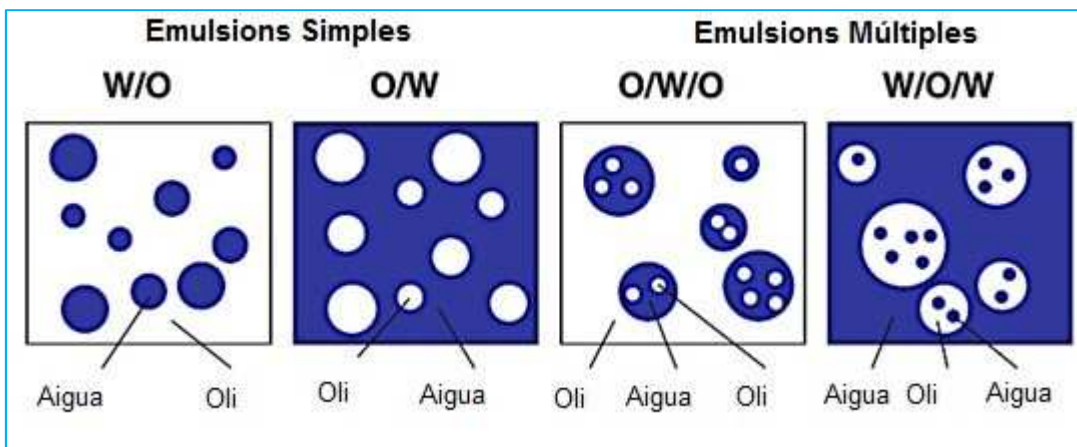


Figura 17: Representació esquemàtica de dues emulsions simples (W/O i O/W) i dues emulsions múltiples (O/W/O i W/O/W).

Les breus consideracions efectuades a l'apartat anterior sobre la formació i estabilització de les emulsions simples donen ja idea de la dificultat per obtenir i estabilitzar emulsions múltiples, així com per aconseguir que les emulsions obtingudes tinguin les mateixes característiques macroscòpiques, microscòpiques i d'estabilitat.

Els emulgents que s'empren per a la seva estabilització són bàsicament els mateixos que per a les emulsions simples, si bé recentment apareixen en el mercat tensioactius de característiques específiques idònies per a l'obtenció d'aquest tipus de sistemes dispersos.

Des del punt de vista de la seva aplicació algunes emulsions múltiples es poden considerar com a reservoris o sistemes de membrana líquida. Efectivament, els compartiments interns i externs estan separats per una membrana líquida capaç de vehicular ingredients actius en ambdós costats. Existeix la possibilitat, en funció de la fórmula de que es disposa, que un ingredient actiu dintre del compartiment intern, en certes condicions, es desplaci al compartiment extern i el sistema es comporti com una forma d'alliberació prolongada. Si l'ingredient actiu està inclòs dintre del compartiment extern, en certes condicions, es desplaçarà al compartiment intern i aquest es comportarà com un sistema "segrestador". Bàsicament, el gran interès despertat per les emulsions múltiples en relació a les emulsions simples es deu a la capacitat de retardar l'alliberació de la substància activa encapsulada. Per tant les emulsions múltiples no sols són sistemes molt més complexos que les emulsions simples, sinó que també constitueixen un camp d'investigació recent i prometedor gràcies a la seva capacitat multicompartmental i les seves capacitats d'alliberació prolongada i sostinguda. Els estudis més nombrosos sobre aquestes emulsions es basen en sistemes W/O/W.

Si a més, es tenen en compte altres factors que entren en el camp de la dermatologia, es constata que els productes exclusivament oliosos actuen de manera oclusiva, mentre que els sistemes polifàsics, com són les emulsions, tenen major agradabilitat al tacte i un menor efecte oclusiu, que seria en sentit de major a menor, les A/O i les O/A, aquestes últimes dites també rentables i que ja no són oclusives.

Les emulsiones múltiples foren observades ja en 1925 per *Seifriz*, quan va detectar la formació de petites gotetes en la fase dispersa d'una emulsió simple i va ser el primer en publicar fotografies al microscopi de les mateixes (*Seifriz, 1925*). *Becher* també observà la formació de gotes múltiples durant la inversió d'una emulsió i *Sherman* comprovà que les anomenades emulsions múltiples s'obtenien de forma inesperada durant el procés d'emulsificació ordinari a altes concentracions de fase dispersada o d'emulgent. *Del Pozo Ojeda i cols.* senyalaren la presència d'aquests sistemes en cerats formulats amb borat sòdic als quals s'han atribuït clàssicament l'efecte refrescant sobre la pell ("cold creams") (*Del Pozo i cols., 1952*).

Però en l'actualitat, la caracterització de les emulsions múltiples fixa paràmetres molt més concrets amb la finalitat no només de garantir-ne l'estabilitat, sinó també de possibilitar l'obtenció de paràmetres reproduïbles tant des del punt de vista físico-químic com biofarmacèutic.

### Nomenclatura

En segon lloc, trobem en la literatura científica denominacions de les emulsions múltiples com ara emulsions dobles o emulsions triples ("double emulsion" o "triple emulsion"). De fet, el terme emulsió doble seria el més apropiat ja que coexisteixen dins el sistema dos emulsions. L'emulsió triple és també acceptable i d'ús habitual, però aquest terme és desaconsellable ja que no s'aplica a emulsions múltiples reals sinó a preparacions diverses constituïdes, per exemple, per un emulsió simple gelificada, o una emulsió amb micropartícules en suspensió o fins i tot una emulsió simple en la qual s'incorpora un ingredient en la fase aquosa i un ingredient en la fase oliosa (*Seiller i cols., 1996*).

Diversos autors han proposat nomenclatures determinades per a identificar els diferents tipus d'emulsions múltiples que es presenten en la pràctica. Així *Florence i Whitehill* (1982) classificaren les emulsions múltiples que obtenien en tres tipus: A, B, C., en funció de la mida i nombre de gotetes a les fases internes de les emulsions múltiples (Fig. 18). Els autors del treball experimental preparen tres tipus diferents d'emulsions aigua-miristat d'isopropil-aigua utilitzant diferents tensioactius no iònics. L'emulsió primària W/O, estabilitzada amb un 2,5% de Span® 80, es redispersa en igual volum d'aigua que conté un 2% de un tensioactiu hidròfil: Brij® 30 en el sistema A, Triton X-165 en el sistema B i una barreja 3:1 de Span® 80/Tween® 80 en el sistema C. Les emulsions del tipus A presenten gotes múltiples petites

(diàmetre aprox. 10  $\mu\text{m}$ ) que generalment (un 80%) contenen una única gota aquosa interna de diàmetre mig pròxim a 3  $\mu\text{m}$ . Les emulsions del tipus B estan formades per gotes múltiples majors (diàmetre aprox. 20  $\mu\text{m}$ ) que contenen nombroses gotetes aquoses més petites (aprox. 2  $\mu\text{m}$ ) que en les emulsions dels tipus A. Els sistemes C presenten gotes múltiples molt grans (diàmetre aprox. 25  $\mu\text{m}$ ) amb un gran nombre de gotes internes en un estat aparentment floculat. Segons *Davis i cols.* (1987) solament les emulsions del tipus C tenen aplicació com sistemes d'alliberació de substàncies.

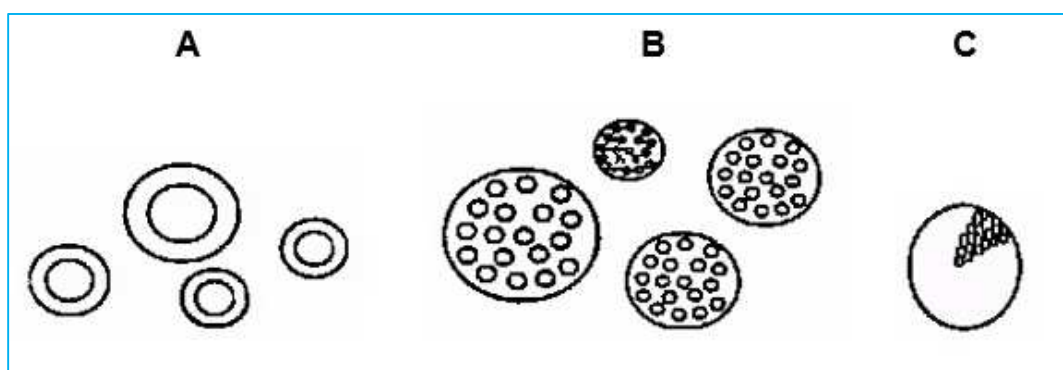


Figura 18: Tipus de emulsions (A, B, C) segons mida i nombre de gotetes en la fase interna (segons *Florence i Whitehill, 1982*).

*Sheppard i Tcheurekdjan* (1977) proposen una notació que utilitza subíndexs per designar les emulsions múltiples. Aquesta notació permet distingir quan la composició de les fases aquoses i/o olioses és idèntica, identificant-les amb un subíndex, mentre que quan són fases de composició diferent tenen subíndexs diferents. Així per descriure una emulsió W/O/W de fases aquoses amb diferents composicions, es pot dir que la fase aquosa  $W_1$  està dispersada en la fase oliosa O, constituint l'emulsió primària  $W_1/O$ , i a la vegada es redispersa en una fase contínua externa de diferent composició ( $W_2$ ). Per tant la notació de l'emulsió múltiple en aquest sistema serà equivalent a la notació  $W_1/O/W_2$ .

Anàlogament, un sistema oli/aigua/oli pot escriure's segons la notació  $O_1/W_1/O_2$ . I si les fases homònimes fossin d'igual composició la notació seria W/O/W i O/W/O respectivament.

Aquests autors denominen els sistemes  $W_1/O_1/W_2$  o  $O_1/W_1/O_2$  com emulsions de segon ordre amb tres constituents. Quan les fases internes i externes són idèntiques, les emulsions W/O/W i O/W/O reben el nom de segon ordre amb dos constituents.

Altres sistemes més complexos poden descriure's com emulsions de tercer ordre, quart, cinquè, etc. Utilitzant doncs aquesta terminologia, les emulsions simples O/W o W/O serien emulsions de primer ordre.

Finalment cal esmentar que en la nomenclatura anglosaxona i francesa les emulsions múltiples A/O/A i O/A/O corresponen a les emulsions W/O/W, O/W/O i H/L/H, L/H/L respectivament.

Quant als emulgents, imprescindibles per establir les interfases de signe contrari que coexisteixen en les emulsions múltiples, solen identificar-se com a emulgent o sistema emulgent primari (E I) i emulgent o sistema emulgent secundari (E II).

Per a les emulsions múltiples del tipus W/O/W, les molècules de l'emulgent I (E I), de tendència lipòfila, s'orienten a la interfase interna W/O, i les de l'emulgent II (E II) de tendència hidròfila, a la interfase externa O/W.

### 1.2.1.3 Mecanismes d'inestabilització de les Emulsions Múltiples

Els mecanismes d'inestabilització de les emulsions múltiples són variats i complexos, i engloben des de l'apropament (similar al cremat) i possible fusió (coalescència) de les gotetes de l'emulsió primària que constitueixen la fase interna de l'emulsió múltiple, fins a l'apropament i conseqüent coalescència de les gotetes que a la seva vegada constitueixen la fase interna de dita emulsió primària. Aquestes gotetes poden també ser "expulsades" de l'emulsió que constitueix la fase interna i per tant, degut a la seva afinitat amb la fase més externa de l'emulsió múltiple, difondre's i desaparèixer en el si d'aquesta.

*Florence i Whitehill* (1981) han estudiat els possibles mecanismes de ruptura d'emulsions múltiples tipus W/O/W. Dits mecanismes s'esquematitzen a la Figura 19:

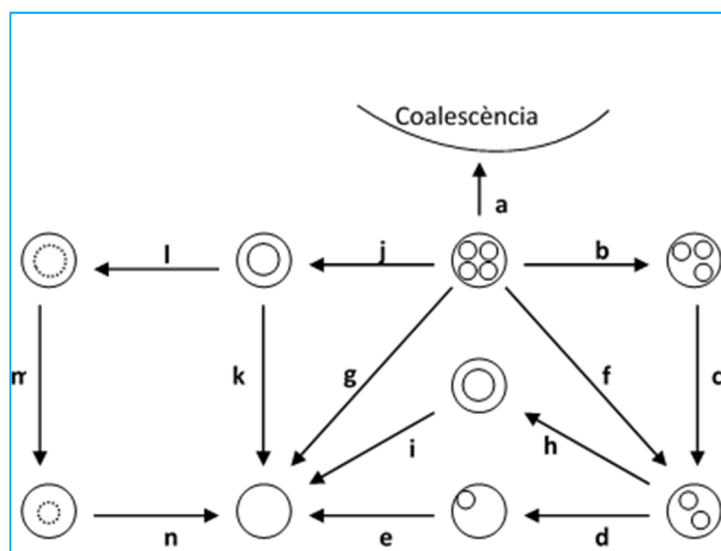


Figura 19: Esquema de les possibles vies de ruptura que poden seguir els sistemes W/O/W (segons *Florence i Whitehill*, 1981).



- (a) Coalescència de les gotes olioses (simples o múltiples);
- (b, c, d, e) Expulsió individual de les gotetes aquoses internes;
- (f) Expulsió de més d'una gota;
- (g) Expulsió de totes les gotetes internes a la vegada (poc freqüent);
- (h, i), (j, k) Coalescència de les gotetes internes abans de l'expulsió;
- (l, m, n) Sortida de l'aigua per difusió, a través de la fase oliosa, produint una reducció gradual de les gotetes internes.

Aquests autors han estudiat en tres sistemes diferents W/O/W, el canvi en el nombre i grandària de les gotes internes, i els canvis de diàmetres de les gotes múltiples durant un període de temps. L'observació d'aquests canvis va permetre als autors dissenyar un esquema de les vies de ruptura de les gotes múltiples (Fig. 19).

#### 1.2.1.4 Composició i mètodes d'obtenció

Avui en dia, les emulsions múltiples ofereixen més estabilitat que en el passat, i la formulació i elaboració a escala de laboratori i industrial s'ha convertit en una tasca més fàcil. Degut a la presència de diferents interfases, la formulació i elaboració d'emulsions múltiples és més complexa i delicada que les emulsions simples i/o clàssiques que posseeixen una sola interfase. De totes maneres, gràcies als nous excipients i concretament els emulgents polimèrics, que proporcionen una pel·lícula forta, gruixuda i ben definida al voltant de la interfase W/O la formulació d'aquestes sistemes ha esdevingut més senzilla (*Seiller i cols., 1998*).

##### 1.2.1.4.1 Principals excipients utilitzats per a Via Tòpica

Els ingredients utilitzats per a la formulació d'aquests sistemes són molt nombrosos i pràcticament idèntics als utilitzats en la producció d'emulsions simples. No obstant això l'elecció de cada un d'ells i la concentració també són uns factors determinants per a la caracterització i estabilitat d'aquests sistemes. L'objectiu d'aquest apartat és recollir la majoria d'ingredients utilitzats per a l'elaboració d'emulsions múltiples en la bibliografia actual i en segon lloc establir els mètodes d'obtenció actualment utilitzats per a l'elaboració d'emulsions múltiples.

En primer lloc els constituents de les diferents fases en funció de la seva hidrofília i lipofília, és a dir els components de la fase oliosa, aquosa i els emulgents, com a possibles components de les diferents fases del sistema dispers. En segon lloc els additius i/o adjuvants que poden contenir aquests sistemes formulacions i la naturalesa de les substàncies encapsulades.

Per últim es descriuen els mètodes més usats avui dia per a l'obtenció d'emulsions múltiples.

A continuació es descriuen els principals excipients emprats en l'elaboració d'emulsions múltiples per via tòpica, classificats en funció de la seva hidrofília i lipofília, com a possibles components de les diferents fases del sistema dispers.

### Fase aquosa

La fase aquosa tant interna com externa està constituïda bàsicament per aigua desionitzada o destil·lada. A més de l'emulgent hidròfil, pot portar addicionades substàncies actives o adjuvants. En la fase aquosa és possible introduir per exemple:

- estabilitzants: sucres, electròlits (NaCl), o caseïnat sòdic.
- modificadors de pH: àcid làctic, fosfat sòdic.
- conservants, per evitar el desenvolupament microbià: parabens, sorbat sòdic.
- hidrocol·loides i polímers que augmenten la consistència i proporcionen una certa reticulació al sistema: gelatina, carboximetilcel·lulosa, pectina, gelosa, gomes (goma xantana), alginats, polímers de l'àcid acrílic (carbomer), etc.
- marcadors per al seguiment de l'estabilitat: glucosa, 6-carboxifluoresceïna, MgSO<sub>4</sub>, colorants, entre d'altres.

Els electròlits són les substàncies més utilitzades. Bàsicament la finalitat d'aquestes substàncies és:

- Promoure un balanç osmòtic entre la fase interna i externa
- Incrementar l'estabilitat dels sistemes mitjançant el fenomen de "salting out". És a dir, hi ha competició entre l'electròlit i el emulgent lipòfil per les molècules d'aigua, el que provoca que l'emulgent sigui menys hidròfil i que emigri cap a la interfase. Això donarà lloc a una interfase més rígida i a una barrera mecànica més efectiva.
- Com a indicadors en la ruptura del sistema

*Nielsen i cols* de Beiersdorf (1994) aconsellen utilitzar concentracions d'electròlits entre 0,3-0,8%. Les emulsions múltiples obtingudes utilitzant aquestes concentracions no van mostrar alteració de la fase interna, de la mida de gotícula, oferien una llarga estabilitat tèrmica a diferents condicions d'emmagatzematge i més oferien una excel·lent compatibilitat sobre la pell. *De Luca i cols* (1990) assenyala que els electròlits són substàncies elementals per estabilitzar l'emulsió primària i troba que la concentració (MgSO<sub>4</sub>) òptima és el 0,7%. En la mateixa línia *Suñer i cols* (1998) avaluen la influència del ClNa en la fase interna de l'emulsió múltiple W/O/W. Els resultats van mostrar que l'addició de NaCl en la fase interna emulsió primària W/O provocava un increment de la viscositat de l'emulsió primària W/O i de l'emulsió múltiple W/O/W. En tots els casos la presència de NaCl en la fase interna estabilitza el

sistema múltiple i l'òptim percentatge de NaCl estava comprès entre 0,4-0,6% (*De Luca i cols., 1990*).

### Fase oliosa

La naturalesa de la fase oliosa pot tenir un efecte significant en la formació i el comportament de les emulsions múltiples. Al igual que les emulsions simples O/W i W/O, algunes característiques com l'oli, la viscositat i la polaritat poden determinar la distribució de la grandària de gota i l'estabilitat de l'emulsió (*Garti, 1998*). Les fases olioses més utilitzades per a la preparació d'emulsions múltiples W/O/W i O/W/O són els hidrocarburs, triglicèrids, èsters i altres substàncies. Quant als hidrocarburs refinats, la parafina líquida és la més utilitzada. També s'han utilitzat hidrocarburs com hexadecà, dodecà, octà, ciclohexà, heptametilnonà, toluè i esqualè entre d'altres. Segons *De Luca* la parafina millor tolerada per obtenir resultats satisfactoris és una parafina viscosa (viscositat entre 110-230 cP), parafines més líquides donen lloc a resultats no tan satisfactoris (*De Luca i cols., 1990*).

Els triglicèrids són àcids grassos saturats i insaturats, de cadena llarga esterificats amb la glicerina. Els triglicèrids més utilitzats per a la formulació d'emulsions múltiples són l'oli de cacauet, oli d'oliva, oli de sèsam, oli d'ametlles dolces, oli de blat de moro, oli de ricí, oli d'avellana, oli de germen de blat, oli de girasol, oli de càrtam, oli d'argan, oli de soja i fins i tot barreja d'olis. Cal ressaltar que en els estudis experimentals publicats es ressalta la dificultat de dispersar els olis descrits anteriorment en la fase aquosa en comparació amb els hidrocarburs (*Davis, 1981*).

Segons *Florence i Whitehill (1982)* el procediment habitual és utilitzar olis minerals ja que produeixen emulsions múltiples més estables que les elaborades amb olis vegetals. *Davis* troba que l'estabilitat de les formulacions amb determinats olis decreixia en aquest ordre: parafina líquida>esqualè>oli de sèsam> oli de blat de moro i cacauet.

Els èsters grassos de cadena llarga més utilitzats són el miristat d'isopropil, oleat d'isopropil, palmitat de octil, palmitat d'isopropil i oleat d'etil. Altres substàncies com ara els èsters d'origen semisintètic com els triglicèrids de cadena mitja (MCT) o caprilat/caprat de trigliceril també són àmpliament utilitzats. Aquestes substàncies són olis lleugers en comparació als descrits anteriorment i produeixen emulsions amb una viscositat menor i una fase externa oliosa menys greixosa.

També s'han utilitzat altres substàncies com alcohols grassos, ceres i algunes silicones soles o barrejats amb altres olis per ajustar la viscositat de la fase grassa, entre d'altres (*Rocha-Filho i cols., 1989*). L'oli de jojoba també s'ha utilitzat per l'elaboració d'EM. Com silicona també s'ha utilitzat l'oli de silicona (DC<sup>®</sup> 200 Fluid 50 CST, Dow Corning).

La naturalesa de la fase oliosa és un factor molt important a l'hora de caracteritzar el producte final. Les característiques fisicoquímiques com la polaritat, densitat i viscositat són molt determinants (*Florence i cols., 1982*).

En la preparació d'una emulsió W/O/W, *Frankenfeld i cols* el 1976 utilitzen una barreja constituïda per proporcions variables de parafina espessa i fluida per variar la viscositat global de la fase oliosa. Els resultats van mostrar que per a una concentració de parafina fluïda superior al 50% l'emulsió és inestable. Per *Panchal i cols (1979)* la viscositat no és només l'únic factor a tenir en compte sobre l'estabilitat de les emulsions múltiples. Els autors comproven que aquests sistemes constituïts per parafina líquida de viscositat elevada era menys estables que sistemes constituïts amb querosè de viscositat molt menor.

Una certa homogeneïtat es desprèn a l'hora d'escollir la concentració de la fase oliosa. És possible constatar que la fase oliosa més freqüentment utilitzada són els hidrocarburs i que la seva concentració es troba entre el 20-50%.

### Emulgents

Els emulgents que s'utilitzen per a l'estabilització d'emulsions múltiples són bàsicament els mateixos que per a les emulsions simples, si bé recentment les indústries de tensioactius han llançat al mercat productes de característiques específiques idònies per a l'obtenció d'aquest tipus de sistemes dispersos. No obstant, en ocasions s'empren també barreges d'emulgents, tant per preparar l'emulsió primària com per preparar l'emulsió múltiple final. A la bibliografia es troben excepcionalment emulsions múltiples preparades amb un sol emulgent (*Distefano, 1983*).

Les emulsions múltiples estan constituïdes per dos líquids immiscibles com a mínim. Per a la seva realització es necessita la presència mínima de dos emulgents, tal com s'ha indicat anteriorment. Per a les emulsions múltiples tipus W/O/W les molècules d'emulgent I, de tendència lipòfila s'orienten a la interfase interna W/O i els de l'emulgent II de tendència hidròfila a la interfase externa O/W. Originen així, si el percentatge i la naturalesa dels emulgents és l'adequat a la fase oliosa, dues pel·lícules monomoleculares. Les parts apolars dels emulgents es troben a la fase oliosa, mentre que la part polar es troba a la fase aquosa interna o externa (*Seiller i cols., 1996*). Segons *Florence i cols (1982)* perquè una emulsió múltiple W/O/W pugui tenir un mínim d'estabilitat han de preparar-se amb dos emulgents, 1 emulgent per estabilitzar l'emulsió W/O (lipòfil) i un emulgent secundari capaç de estabilitzar una emulsió O/W (hidròfil), i aquest és el pilar bàsic per a la preparació de sistemes múltiples.

Per a les emulsions múltiples tipus W/O/W les molècules de l'emulgent I, de tendència lipòfila s'orienten a la interfase interna W/O i les de l'emulgent II de tendència hidròfila a la interfase externa O/W. Originen així, si el percentatge i la naturalesa dels emulgents és l'adequat a la fase oliosa, dues pel·lícules monomoleculares. Les parts apolars dels emulgents es troben a

la fase oliosa, mentre que la part polar es troba a la fase aquosa interna o externa. Així doncs els emulgents així disposats formaran amb la fase oliosa un embolcall a les vesícules aquoses internes.

En la preparació d'emulsions múltiples s'utilitzen tensioactius aniònics (tot tipus de sabons), tensioactius catiònics (sals d'amoni quaternaris, o sals d'amines) i tensioactius no iònics (èsters de glicerol, de sorbità o de sacarosa). S'han utilitzat fins i tot emulgents de procedència microbiana aïllats de soques de *Corynebacterium Sp.* PPS-II. (Panchal i cols., 1979).

El tipus d'emulgent seleccionat depèn de l'aplicació de l'emulsió múltiple. És evident que segons l'aplicació en la indústria cosmètica, farmacèutica i alimentària, la toxicitat dels components és un factor a considerar. *Matsumoto* assenyala també que per a l'obtenció d'uns nivells òptims de gotes múltiples cal la utilització de tensioactius no iònics en detriment dels emulgents iònics (*Matsumoto i cols.*, 1976). Els tensioactius no iònics (èsters de glicerol, de sorbita, de sacarosa) representen la majoria dels emulgents emprats per a l'elaboració d'emulsions múltiples atès que són menys tòxics, presenten menys incompatibilitats, la seva efectivitat no es veu modificada per variacions de pH, tenen poca interacció amb components iònics i a més són ben coneguts en la formulació d'emulsions (*Florence i cols.*, 1982; *De Luca i cols.*, 1988).

Com s'ha indicat, per formar una emulsió múltiple es requereixen com a mínim dos emulgents: un emulgent I per formar l'emulsió primària i un altre emulgent II per estabilitzar aquesta fase enfront a la fase externa de l'emulsió múltiple. No obstant en ocasions s'han utilitzat barreges d'emulgents tant per preparar l'emulsió primària com per preparar l'emulsió múltiple.

Tot i que hi ha emulgents i fases olioses molt més adaptades que altres, tots els constituents habituals de les emulsions permeten obtenir emulsions múltiples, tot i que vegades s'han de satisfer certes condicions relatives com poden ser les concentracions òptimes dels emulgents I i II, i l'HLB de la barreja d'emulgents. Qualsevol que sigui el tipus d'emulgent utilitzat existeix una concentració òptima per estabilitzar el complex sistema i trobar un equilibri entre les proporcions relatives dels mateixos.

Dins dels emulgents més emprats cal destacar els no iònics. Cal assenyalar, pel que fa als E I, els èsters de sorbità de cadena llarga hidrocarbonada, els derivats perfluorats i sobre tot els emulsionants macromoleculars tipus cetil-dimeticona-copoliol (CDC). Pel que fa al E II els més utilitzats són els èsters de sorbità polioxietilenats, els copolímers d'òxid d'etilè i d'òxid de propilè, els alcohols grassos fortament etoxilats i els condensats de poliglicerol (*Seiller i cols.*, 1996).

*Matsumoto i cols.* (1976) demostren que el principal factor que influeix en la formació d'una emulsió W/O/W és la relació entre l'emulgent lipòfil en la fase oliosa i l'emulgent hidròfil en la fase aquosa contínua. Indiquen que per preparar una emulsió W/O/W (aigua/parafina líquida/aigua) mitjançant el procediment de dues etapes (veure l'apartat següent) amb un rendiment de glòbuls múltiples igual o superior al 90% aquesta relació ha d'ésser 10/1 o superior, i utilitzen concentracions superiors al 30% de l'emulgent lipòfil Span<sup>®</sup> 80 (emulgent I) en la fase oliosa. Si augmenta la concentració d'emulgent II en la fase aquosa, el rendiment disminueix sensiblement degut a la solubilització de l'emulgent I en la fase aquosa externa, donat que la concentració d'emulgent II és elevada i superior a la seva concentració micel·lar crítica. Així, quant més augmenta la concentració de l'emulgent I, s'incorpora en les micel·les de l'emulgent II, per el que disminueix la concentració d'emulgent I en la fase oliosa capaç d'estabilitzar el sistema W/O. Aquest fet pot provocar la ruptura de la fase oliosa i la pèrdua dels glòbuls aquosos interns. En canvi, un increment de la concentració d'emulgent lipòfil proporciona major rendiment de gotes múltiples. Si bé *Matsumoto i cols.* utilitzen concentracions d'emulgent lipòfil superiors el 30%, habitualment s'utilitzen concentracions compreses entre el 1 i 10%.

En aquest sentit *Matsumoto i cols.* (1976) van trobar que la utilització de tensioactius no iònics en la segona etapa de emulsificació oferia un rendiment major en gotes múltiples que emprant tensioactius iònics. Més recentment s'han introduït emulgents polimèrics com els alquil-dimeticones-copoliols molt versàtils, però la seva innocuïtat després de l'administració oral a llarg termini queda per confirmar. Altres emulgents utilitzats freqüentment són els emulgents polimèrics com ara els copolímers d'òxid d'etilè i òxid de propilè (polyoxyethylene /polyoxypropylene block copolymer), (*Whitehill, 1981*). Per als emulgents hidròfils s'utilitzen els copolímers d'òxid d'etilè i òxid de propilè, també es troben els emulgents tipus èster i una cadena llarga hidrocarbonada. Cal assenyalar que referent als emulgents E I, els èsters de sorbita de cadena llarga hidrocarbonada, els derivats perfluorats i sobretot els emulsionants macromoleculars tipus cetil-dimeticona-copoliol. Els emulgents E II dels més utilitzats són els èsters de sorbità polioxietilenats, els copolímers d'òxid d'etilè i òxid de propilè, els alcohols grassos.

Segons *Florence i Whitehill* (1982) la preparació d'emulsions W/O/W requereix un valor òptim de HLB del tensioactiu lipòfil comprès entre 2-7 i en l'interval 6-16 per al tensioactiu hidròfil. Altres autors situen els marges en 3-6 i 8-18 (*Liebowitz, 1977*) respectivament o 2-6 i 10-16 (*De Luca i cols., 1988*) respectivament.

### Emulgents polimèrics

Molts treballs científics publicats estan basats en els emulgents comercials de tipus no iònic. Malauradament molts d'aquests tensioactius produeixen emulsions múltiples amb una estabilitat limitada. Durant aquests últims anys s'han formulat emulsions múltiples amb

emulgents polimèrics tant per a l'emulsió primària com la secundària. Aquest tipus de tensioactius poden mostrar respecte als tensioactius no iònics una eficàcia superior pel que fa a l'estabilitat dels sistemes obtinguts.

Un tensioactiu polimèric és un homopolímer format per estructures repetitives anomenades "blocs": òxid de polietilè (POE); polivinilpirrolidona (PVP); àcid poliacrílic (PAA). Aquests homopolímers són hidrofílics i tenen una activitat en la interfase W/O.

Un dels exemples més representatius són els "A/B/A block copolymers" per a l'estabilització d'emulsions W/O: Pluronic® (de BASF) i Synperonic® PE \* (Evonik Industries). Aquests tri-blocs copolímers consisteixen en dos blocs de Polietilenglicol (POE) i un bloc d'òxid de polipropilè (PPO). Un altre exemple d'aquests tensioactius és el Arlacel® P135 (Evonik Industries). Aquest consisteix en dos blocs d'àcid polihidroesteàric (PHS) i un altre bloc d'òxid de polietilè (POE). La cadena POE és soluble en aigua i proporciona un gran ancoratge a la interfase i les cadenes PHS són molt solubles en la majoria de solvents hidrocarburs i la majoria de solvents polars.

#### Altres Components i Estabilitzadors

Viscositzants com acàcia, gelatina, goma xantana, cel·lulosa i els seus derivats són el més utilitzats per incrementar la viscositat i consegüentment l'estabilitat al sistema. La incorporació d'additius permet millorar l'estabilitat de les emulsions múltiples. És possible introduir per exemple:

- Modificadors de pH: àcid làctic, fosfat de sodi, trietanolamina.
- Conservants: per evitar el desenvolupament microbià. Per exemple, parabens, sorbat sòdic i altres.
- Hidrocol·loids i polímers que augmenten la consistència i proporcionen una certa reticulació al sistema: gelatina, acàcia, derivats de cel·lulosa (carboximetilcel·lulosa, ...), pectina, gelosa, gomes (goma xantana), alginats, polímers de l'àcid acrílic (carbomer), Veegum®, Aerosil®, alcohols grassos, sals d'alumini, PVP, etc ...
- Altres substàncies: BSA, aminoàcids.

#### 1.2.1.4.2 Mètodes d'obtenció de les Emulsions Múltiples W/O/W

Les emulsions múltiples tipus W/O/W són les que troben major camp d'aplicació per via tòpica. Per aquesta raó a continuació es centrarà l'estudi en aquest tipus de formulacions, objecte del treball experimental que es presenta.

El procediment emprat per a obtenir les emulsions múltiples és un factor determinant en les característiques del producte acabat. Si la tècnica operatòria no és l'adequada, o no estan correctament establertes les condicions de temperatura, velocitat d'agitació, temps

d'abocament, etc, no només pot passar que amb una mateixa fórmula s'obtinguin emulsions múltiples cada vegada de característiques físico-químiques diferents (quant a la reologia, mida de les gotetes, estabilitat, etc), sinó que a partir d'una fórmula dissenyada per obtenir una emulsió múltiple, es pot obtenir una emulsió simple.

Així doncs, els diferents autors proposen metodiques específiques per a l'obtenció de les emulsions múltiples, si bé l'ampli ventall de possibilitats que teòricament existeix no sempre es pot aplicar perquè depèn bàsicament de les característiques dels emulgents.

El procediment més clàssic d'obtenció d'emulsions múltiples d'aplicació tòpica que, pel seu ampli camp d'aplicació engloben la majoria dels sistemes emulgents, és el d'obtenció d'emulsions múltiples en dues etapes, si bé en casos concrets s'aconsellen altres metodiques. Les diferents tècniques d'obtenció han estat molt ben didàcticament exposades per *Seiller* i es transcriuen a continuació (*Seiller i cols., 1998*).

- Procediment en dues etapes
- Procediment per inversió de fases
- Procediment per dispersió d'una fase laminar
- Procediment per inversió d'un isòtrop oliós

*Sherman* afirma que els sistemes múltiples es poden obtenir de dues maneres. Un mètode seria un sistema amb una alta concentració de fase dispersada i l'altre a força d'estabilitzar el sistema amb una barreja de emulgent hidròfil i lipòfil (1968). La formulació i elaboració d'emulsions múltiples és un procés complex i delicat comparat amb les emulsions clàssiques degut bàsicament a la presència de dos interfases. Però els procediments utilitzats d'obtenció que existien en els últims anys han pogut ser millorats i validats, com són el procés en dues etapes i el procés per inversió de fases, i s'obtenen uns alts nivells de reproducció. Dels mètodes que es descriuran a continuació el mètode en dues etapes d'emulsificació poden encapsular principis actius amb més efectivitat i nombrosos investigadors han estudiat la formulació i aplicació de les emulsions múltiples usant aquesta metodica (*Okochi, 2000*).

#### Tècniques d'elaboració

En el treball experimental que es presenta en aquesta memòria tots els sistemes dispersos tipus emulsions múltiples s'han preparat mitjançant la tècnica descrita a la literatura científica com mètode en dos etapes segons Fig. 20 (*Matsumoto i cols., 1976*).

Aquest mètode va ser descrit per primera vegada per Herbert el 1965. La primera etapa consisteix en la preparació de l'emulsió primària W/O i la segona etapa, en la dispersió d'aquesta emulsió en aigua que conté un tensioactiu hidròfil. L'emulsió primària W/O és prepara abocant sota agitació la fase aquosa sobre la fase oliosa que conté l'emulgent I



(lipòfil) dissolt i prosseguint l'agitació durant un temps (d'uns segons a diversos minuts). Un percentatge d'aquesta emulsió (entre el 78% i 22%, segons els autors) s'aboca acuradament sobre una solució aquosa de emulgent II (hidròfil) i s'agita durant un temps que oscil·la entre uns segons i diversos minuts. Segons de *Luca i cols.*, la segona etapa d'emulsificació és clau per a l'obtenció d'una emulsió múltiple estable (*De Luca i cols., 1988*). A la primera etapa d'emulsificació és pot efectuar amb els procediments habituals com els ultrasons o l'homogeneïtzació. En la segona etapa s'utilitzen agitadors de baixa potència i fins i tot agitació manual (*Florence, 1982*). L'agitació amb la qual es dispersen les gotes, constitueix un factor crític per a l'estabilitat de les emulsions múltiple. El primer pas consisteix en preparar, a 70-80 °C una emulsió simple de fase contínua oliosa. Sigui quin sigui el sistema, l'aigua, l'oli i els emulsionants, són barrejats mitjançant un agitador de turbina clàssic al voltant de 30 minuts a una velocitat de 1000 rpm. En una segona fase, pel mètode en dues etapes, l'emulsió en fase contínua oliosa és afegida lentament a la fase aquosa. La segona dispersió es realitza igualment mitjançant un agitador de turbina, normalment a temperatura ambient, durant un temps al voltant de 30 minuts, però a una velocitat més baixa, de l'ordre d'alguns centenars de voltes per minut.

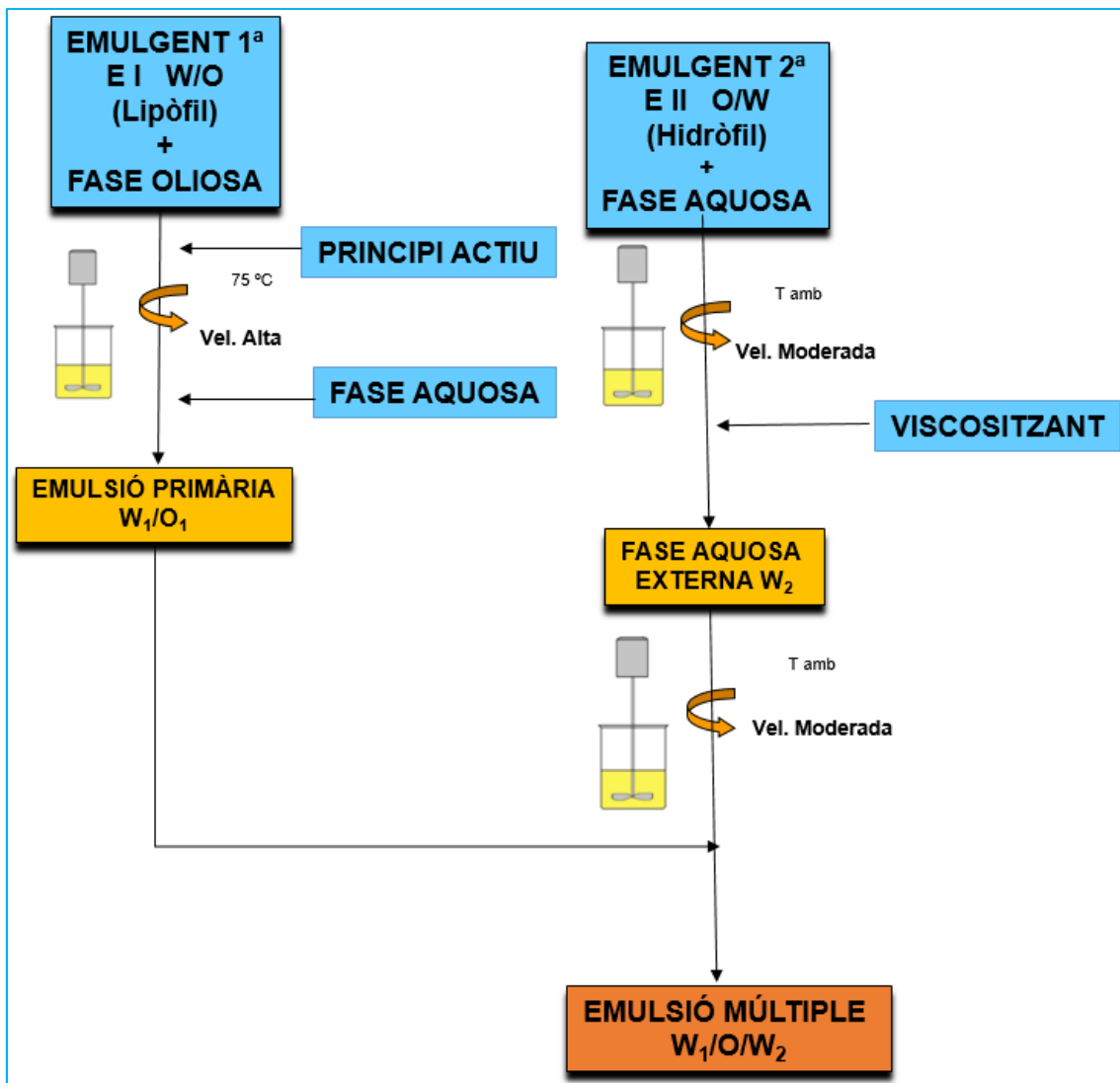


Figura 20. Esquema de la preparació d'emulsions múltiples segons procediment en dues etapes descrit per *Matsumoto i cols* (1976).

#### 1.2.1.1 Aplicacions de les Emulsions Múltiples

Les emulsions múltiples troben aplicació en la indústria farmacèutica, cosmètica, i alimentària fonamentalment per l'encapsulació de principis actius, ingredients cosmètics, nutrients, enzims, aromatitzants i altres substàncies.

Herbert i cols publiquen el 1965 el primer treball interessant concernent a les aplicacions de les emulsions múltiples per a la administració de certes vacunes. Avui en dia s'ha posat de manifest la importància terapèutica d'aquests sistemes per a la aplicació en la indústria farmacèutica. El clar exemple està en les nombroses publicacions científiques publicades a nivell internacional. Si bé, actualment encara no existeix cap preparat farmacèutic en el mercat si que es troben diferents patents de productes cosmètics en el mercat de diferents laboratoris.

En el camp farmacèutic s'utilitzen les emulsions múltiples per a l'administració oral, parenteral i tòpica. Així, com a exemple d'aplicacions més representatives podem esmentar:

- Sistemes d'alliberació prolongada i sostinguda de medicaments
- Sistemes d'alliberació dirigits (“*Drug Targeting Delivery*”)
- Vehicles per a l'administració de vacunes
- Tractaments de detoxificació, en sobredosi de fàrmacs, i immobilització d'enzims
- Protecció de substàncies en front l'ambient extern
- Emmascarar el gust desagradable de certs principis actius
- Substitutius d'eritròcits

El potencial d'aplicació més important es basa en aprofitar el sistema d'alliberació controlada d'un principi actiu incorporat en la fase més interna de l'emulsió múltiple. Això ofereix interessants aplicacions per a l'encapsulació de substàncies actives. En aquest sentit les aplicacions farmacèutiques més importants es caracteritzen per aprofitar la difusió d'un principi actiu incorporat en la fase més interna de l'emulsió múltiple fins la fase més externa amb la finalitat de prolongar l'acció de certes substàncies. Per exemple: antiinflamatoris (indometacina), anticancerígens (5-fluoro-uracil, metotrexat), antimalàrics (cloroquina), antagonistes opiacis (naltrexona), antiglaucomatosos (pilocarpina), antibiòtics (bencilpenicil·lina, cefaloridina), analgèsics potents (pentazocina), antiasmàtics (terbutalina), antiglaucomatosos, hipoglucemiants (insulina).

També es dona el cas contrari, és a dir, orientada a aconseguir una difusió fins la fase més interna de l'emulsió múltiple, i així poder detoxificar per captació de substàncies en casos de sobredosi (barbitúrics i salicilats) i per a la immobilització de certs enzims (lipasa, ureasa i amilasa).

A continuació es detallen les aplicacions més importants sobre la utilització de les emulsions múltiples per a les aplicacions tòpiques i mucoses.

#### *1.2.1.4.3 Emulsions Múltiples d'aplicació Tòpica*

Les possibilitats d'aplicacions tòpiques de les emulsions múltiples per a l'alliberació d'una substància activa estan, avui en dia, en fase d'estudis de preformulació. En efecte, fins ara solament hi ha un nombre limitat de treballs publicats. Tot i així el camp d'aplicació és cada dia més clar tant en l'àmbit de la via tòpica sobre mucoses (amb prometedors estudis que demostren l'eficàcia d'aquests sistemes de dosificació per a modular l'alliberament de substàncies actives) com en l'àmbit de la via tòpica sobre la pell i, tant des del punt de vista dermatològic com estrictament cosmètic.

Via tòpica sobre mucoses

El primer estudi referent a l'interès potencial de les emulsions múltiples després de l'administració sobre una mucosa va ser publicat per *Attia i cols.* 1986. Els autors determinen el coeficient de difusió del hidroclorat de pilocarpina present en diferents sistemes emulsionats (emulsions O/W, W/O i emulsions múltiples W/O/W i O/W/O), en solucions aquoses a l'1% i en suspensions olioses. Els resultats indiquen que el coeficient de difusió del principi actiu en aquests sistemes és independent de la localització del principi actiu. En els assaigs *in vivo* s'avalua el temps de resposta a la pilocarpina en l'activitat en l'ull de conills, la mesura de l'efecte miòtic i de la pressió intraocular (IOP) i el temps de miosi. Quan la pilocarpina és administrada en forma de suspensió, el tensioactiu emprat retarda l'aparició del pic de pressió intraocular (IOP) però no el de l'efecte miòtic. L'aplicació d'emulsions simples -sigui O/W o W/O- comporta un mateix temps de latència del pic de IOP, però amb diferent amplitud. Es nota diferència també en el temps de latència i en l'amplitud de la resposta miòtica. Les emulsions múltiples O/W/O i W/O/W produeixen idèntica amplitud del pic de IOP, però les emulsions W/O/W retarden molt l'aparició del pic.

*Kassem i cols.* (1994) preparen una emulsió múltiple d'hidrocortisona per avaluar la biodisponibilitat del principi actiu a l'ull. La biodisponibilitat en l'ull es valora mitjançant un estudi comparatiu entre emulsions múltiples O/W/O i W/O/W, emulsions O/W, W/O i solucions aquoses. S'observa que la biodisponibilitat augmenta segons l'ordre següent: solució, O/W, W/O/W, O/W/O. A més a més, els paràmetres sobre l'activitat del principi actiu, dependents de la naturalesa de la fase oliosa de l'emulsió, augmenten segons l'ordre: solució aquosa, W/O/W, O/W, W/O i O/W/O. L'estudi conclou suggerint l'ús del sistema O/W/O perquè representa el sistema d'alliberació òptim de la hidrocortisona. El mateix autor desenvolupa altres emulsions múltiples O/W/O i W/O/W de prednisolona i avalua el sistema d'alliberació del principi actiu en l'ull de conills. El principi actiu sempre és incorporat en la fase externa de l'emulsió múltiple sense dependre del tipus d'emulsió. La finalitat de l'estudi és examinar la relació entre el volum de la fase externa i els paràmetres d'activitat del principi actiu en l'ull (*Kassem i cols.*, 1995).

*Ismail i cols.* preparen i comparen una emulsió simple i una emulsió múltiple amb una solució aquosa i micel·lar d'hydroclorat de xilocaïna al 2.5% per l'administració oftàlmica. L'estudi conclou mostrant que l'emulsió múltiple de xilocaïna presenta allargament en l'acció, menor irritació en l'ull i major eficàcia demostrada en comparar-la amb la solució aquosa (*Ismail i cols.*, 1989).

Via tòpica sobre la pell

*Kundu i cols.* estudia emulsions múltiples W/O/W i O/W/O d'aplicació dèrmica. Dites emulsions estan composades per parafina líquida, èsters de sorbità i traçadors com el

salicilat de sodi i salicilat de metil. S'estudien *in vitro* després de l'aplicació sobre una cèl·lula de Franz equipada amb una membrana semipermeable d'acetat de cel·lulosa i també *in vivo*, després de l'aplicació sobre l'abdomen de porc (Seiller i cols., 1996).

Raynal i cols. (1993) posen a punt una emulsió múltiple W/O/W per al tractament de l'acne. En la fase oliosa intermèdia es vehicula l'espironolactona, en la fase aquosa externa una sal de clorhexidina, i dins en la fase aquosa interna el lactat de sodi. Per tant, aquesta emulsió múltiple incorpora tres principis actius amb la finalitat d'obtenir una triple acció: per un costat, tractament de l'acne per l'espironolactona, per altre costat combatre els bacteris amb la sal de clorhexidina i finalment hidratar l'epidermis, sovint seca, amb el lactat de sodi. Els estudis d'avaluació de l'activitat d'aquesta emulsió després de l'aplicació sobre la pell estan encara per publicar.

Tokgoz i cols. (1996) avaluen el comportament d'una emulsió múltiple W/O/W de vitamina C. El treball consisteix inicialment en encapsular la vitamina C dintre de la fase aquosa interna d'una emulsió W/O/W amb la finalitat de protegir-la contra l'oxidació i posteriorment estudiar la influència *in vitro* del vehicle sobre la difusió transcutània de la vitamina C. L'emulsió mostra una gran estabilitat a temperatura ambient (>2 anys) i la propietat de protegir la molècula contra l'oxidació. L'absorció percutània de la vitamina C, prèviament marcada, s'avalua *in vivo* en biòpsia de pell de ratolins en una cèl·lula de difusió del tipus Franz i es compara amb una emulsió W/O i una solució hidroalcohòlica. Els resultats obtinguts han permès afirmar que el millor vehicle per a l'absorció de la vitamina C segueix l'ordre: W/O/W, W/O i solució hidroalcohòlica.

Laugel i cols. (1998) publiquen un treball en que investiguen l'alliberació de la hidrocortisona en diferents vehicles i la distribució del principi actiu sobre la pell (dermis i epidermis) després de l'absorció percutània. El treball consisteix en comparar una emulsió múltiple O/W/O amb una emulsió simple W/O en termes d'oclusivitat i romanència. La romanència s'avalua utilitzant un sebòmetre que mesura els nivells d'oli en la pell. L'oclusivitat es determina segons un mètode gravimètric. L'estrat corni es representa per un disc de gelatina amb una humitat relativa del 100%. S'avalua la pèrdua d'aigua a través d'aquest disc cobert per una fina capa d'emulsió.

Fredro-Kumbaradzi i cols. (1996) preparen una emulsió múltiple W/O/W d'hidroclorat de lidocaïna incorporat en la fase aquosa interna pel procediment d'emulsificació en dues etapes. L'autor investiga el gradient de pressió osmòtica entre les dues fases aquoses en presència de diferents quantitats de clorur de sodi incorporats inicialment en la fase aquosa interna. Els assaigs es completen mitjançant estudi microscòpic, determinació de la grandària de partícula, conductimetria i reologia.

Alguns autors afirmen que l'aplicació de la vitamina C per via tòpica inhibeix les radiacions UV que danyen la pell dels porcs. La vitamina C (àcid ascòrbic) té com a funció ser un cofactor biològic i antioxidant. També presumiblement se li han associat beneficis en importants patologies que van des del càncer fins al refredat comú. *Silva i cols.*, han assajat una emulsió múltiple O/W/O de vitamina C. En aquest estudi es compara els resultats d'una emulsió O/W i una emulsió O/W/O utilitzant en els dos casos la mateixa fase oliosa i aquosa per determinar el potencial d'ús d'aquest complex sistema per l'aplicació tòpica. Els assaigs han demostrat que la baixa alliberació de l'àcid ascòrbic de les emulsions múltiples O/W/O suggereixen la utilització d'aquests sistemes complexos per a l'aplicació tòpica de vitamina C sobre la pell (*Silva i cols.*, 1997).

Les emulsions múltiples en cosmètica constitueixen un àmbit cada vegada més estudiat ja que la utilització d'aquests sistemes tenen l'avantatge de:

- possibilitar la distribució de tres ingredients en tres fases
- possibilitar la protecció de substàncies actives incorporant-les a la fase interna de l'emulsió primària
- possibilitar l'alliberació controlada i permanent d'ingredients actius vehiculats a la fase més interna
- permetre combinar les propietats d'hidratació i protecció d'una emulsió W/O amb la sensació de frescor d'una emulsió O/W

Així les emulsions múltiples W/O/W resulten excel·lents per preparar formulacions cosmètiques. Una aplicació bàsica podria ser de formular un producte, per exemple un ingredient soluble en aigua ( $\alpha$ -hidroxiàcids), un ingredient soluble en oli (perfum) i un altre ingredient soluble en aigua (una vitamina). En aplicar-se sobre la pell pot controlar-se el nivell de ruptura de l'emulsió múltiple per proporcionar un efecte "retard" en l'alliberació dels ingredients actius. Per altre part, també pot controlar-se la reologia de l'emulsió (utilitzant agents espesants o gelificants en la fase externa) per augmentar el seu efecte cosmètic sobre la pell. En realitat la majoria d'estudis procedeixen d'emulsions múltiples W/O/W i encara són pocs els estudis amb emulsions O/W/O.

#### 1.2.1.4.4 Les Emulsions Múltiples com sistemes per al disseny de micropartícules

Les emulsions múltiples poden constituir una etapa intermèdia en l'obtenció de diferents formes de dosificació. La preparació de micropartícules a partir d'emulsions múltiples obre un extens camp de possibilitats, ja que substàncies hidrosolubles i liposolubles podrien ser incorporades respectivament. Avui en dia hi ha nombroses tècniques de microencapsulació que utilitzen emulsions múltiples per a la formació dels sistemes d'alliberament de micropartícules.

Els compostos actius, com els pèptids i les proteïnes, s'estan convertint cada vegada més en un tipus més important d'agents terapèutics, resultat de l'alt nivell de coneixement de la funció d'aquestes substàncies en fisiopatologia i dels ràpids avenços en el camp de l'enginyeria genètica i/o biotecnològica (*Hutchinson i cols., 1990*). El desenvolupament de les tècniques de DNA recombinant ha permès que aquests compostos estiguin disponibles a major escala que en el passat. No obstant això, els pèptids i les proteïnes disponibles, es caracteritzen generalment per una curta semivida biològica, es degraden fàcilment pels enzims, i la majoria d'ells no travessen bé les barreres biològiques a causa de la seva poca capacitat de difusió i al seu baix coeficient de repartiment, el qual és desfavorable per a la difusió en membranes lipídiques (*Couvreur i cols., 1993*). Per aquestes raons, la encapsulació d'aquest tipus de principis actius en sistemes d'alliberament de micropartícules utilitzant diferents tipus de polímers biodegradables s'han estudiat molt intensament durant aquests últims 25 anys (*Blanco-Prieto i cols., 1998*).

Un dels mètodes més comuns per a la preparació de micropartícules és el mètode d'evaporació del solvent de la fase interna d'una emulsió O/W. Aquests sistemes O/W impliquen la dispersió d'una solució orgànica del polímer i del principi actiu, en una fase aquosa contínua. Els fàrmacs lipòfils han estat retinguts amb cert èxit en micropartícules preparades mitjançant aquest mètode, mentre que es va observar poca eficiència d'encapsulació amb fàrmacs hidròfils, que es desplaçaven de la fase orgànica dispersa a la fase aquosa contínua (*Blanco-Prieto i cols., 1998*).

Des que es va poder desnaturalitzar l'estructura de certes proteïnes en presència d'un dissolvent orgànic (*Middaugh i cols., 1990*), i amb la finalitat de millorar la incorporació de molècules hidrosolubles dins de les micropartícules, s'han desenvolupat diferents mètodes de microencapsulació. Tots aquests mètodes suposen en la majoria de casos, l'ús de sistemes d'emulsions múltiples, que són adequats per a la microencapsulació de pèptids, proteïnes i, en general, de compostos hidrosolubles (*Blanco-Prieto i cols., 1998*).

#### *1.2.1.4.4.1 Micropartícules: Tècniques de preparació emprant Emulsions Múltiples*

Actualment hi ha diferents tècniques de microencapsulació que parteixen d'emulsions múltiples, per a la formació de sistemes d'alliberament sostingut de micropartícules. La tècnica d'evaporació de solvent d'un sistema W/O/W per a la preparació de micropartícules és el mètode més utilitzat i investigat. El mètode d'evaporació del solvent W/O/W usant polímers biodegradables el va desenvolupar inicialment el grup industrial japonès *Takeda* (*Blanco-Prieto i cols., 1998*) amb la finalitat de millorar l'encapsulació de fàrmacs hidròfils en micropartícules. Aquesta tècnica de preparació de micropartícules, també denominat "mètode d'assecat en aigua", consisteix en dissoldre el principi actiu en aigua destil·lada (fase aquosa interna) i el polímer en un dissolvent orgànic volàtil immiscible en aigua (fase orgànica). Posteriorment s'emulsiona el sistema incorporant la fase aquosa interna sobre la

fase orgànica obtenint d'aquesta manera l'emulsió primària o emulsió interna (W/O). Aquesta emulsió W/O s'introdueix, sota agitació intensa i utilitzant un agitador mecànic (*Blanco Prieto i cols., 1994*), en la fase aquosa externa que conté un emulgent, formant l'emulsió múltiple W/O/W. L'emulsió múltiple resultant es manté sota agitació contínua, aplicant buit per així permetre, que s'evapori el dissolvent de la fase orgànica, induint la precipitació del polímer, i per tant la formació de micropartícules carregades del fàrmac.

#### 1.2.1.4.4.2 Aplicacions

Aquesta tècnica d'evaporació de solvent d'un sistema W/O/W permet encapsular amb èxit principis actius hidrosolubles (per exemple: pèptids, proteïnes, antígens) en una gran varietat de polímers. Dins d'aquests polímers el PLA i PLG, copolímers de l'àcid polilàctic i de l'àcid polilàctic/glicòlic, els polímers més investigats i avançats, són els més àmpliament utilitzats per la seva excel·lent biocompatibilitat. L'ús de sistemes d'alliberament basats en micropartícules preparades per la tècnica W/O/W té, al seu torn, un futur prometedor en terapèutica com ara la possibilitat d'aconseguir l'alliberament d'antígens o pèptids per via parenteral i també ofereixen perspectives interessants per a l'administració oral d'antígens.

Actualment el disseny de micropartícules obre un gran camp d'aplicació en terapèutica d'aquests sistemes. Només s'ha de veure que en qualsevol base de dades de caràcter mèdic es recullen sempre un gran nombre de publicacions al respecte. En aquest sentit les principals aplicacions es troben en l'alliberament d'antígens, vacunacions d'administració oral, vacunes unidosis i l'alliberament de pèptids entre d'altres (*Blanco-Prieto i cols., 1998*).

#### 1.2.1.4.5 Les Emulsions Múltiples en la Indústria Alimentària

Les aplicacions potencials de les emulsions múltiples en la indústria alimentària han estat objecte d'estudi més recentment, comparat amb altres camps d'aplicació (*Matsumoto i cols., 1981, 1985*). En aquest sentit en els últims anys s'han presentat nombrosos treballs experimentals i patents que abasten les aplicacions en la indústria alimentària, sobretot en el mercat japonès on es troba el major nombre de publicacions i patents, amb relació al mercat europeu on no hi ha encara cap producte en el mercat (*Raynal, 1998*).

Tal com es veurà, un cop llegit aquest capítol, es podran apreciar la similitud existent entre les aplicacions que cerca la indústria farmacèutica i les que interessen a la indústria alimentària. Un clar exemple és l'emascament de qualsevol ingredient contingut en una emulsió múltiple per pal·liar l'efecte desagradable de qualsevol principi actiu o ingredient alimentari.

Hi ha bàsicament dos aspectes que tenen interès per a la utilització de les emulsions múltiples en tecnologia alimentària:



- L'existència d'una fase aquosa (o oliosa) encapsulada en una emulsió O/W/O (o W/O/W) que permet la protecció de nutrients en diversos tipus de menjars, agents aromàtics volàtils, així com el control del seu alliberament (*Dickinson i cols., 1994; Owusu i cols., 1992*).

- En necessita menys fase oliosa per elaborar una emulsió W/O/W, comparat amb una emulsió O/W amb la mateixa fracció de volum de fase dispersada. Per tant les emulsions múltiples poden ser usades en el desenvolupament de productes baixos en calories, productes alimentaris de contingut reduït en greixos ("low-fat products"), com ara productes per amanir, maioneses o productes per untar o estendre. Així mateix, en aquests casos, les emulsions múltiples presenten les mateixes propietats reològiques que les emulsions simples O/W (*Raynal i col., 1998*).

A continuació es presenten algunes de les aplicacions més recents de les emulsions múltiples en la indústria alimentària. Bàsicament aquestes aplicacions poden resumir-se en:

- Encapsulació d'ingredients volàtils o sensibles: Existeixen aplicacions que fan referència a la reducció en l'alliberament d'ingredients encapsulats, emascarar el gust desagradable d'ingredients, encapsulació de saboritzants (*Dickinson i cols., 1994; Owusu i cols., 1992*).
- Formulació de productes amb baix contingut en greixos.
- Formulació de productes per amanir i untar o estendre.
- Estabilització d'escumes (*Raynal i cols., 1998*).

#### 1.2.1.5.4 Emulsions Múltiples en la Indústria Química: Processos de Separació a través de Membranes Líquides

Alguns autors han descrit les emulsions múltiples com "membranes líquides", ja que el líquid que separa les dues fases actua com una membrana semipermeable en el qual el solut pot difondre d'una fase a una altra (*Florence i cols., 1982*).

En general els processos de separació a través de membrana inclouen dues fases líquides separades per una tercera fase que correspon a una membrana fina. Habitualment aquestes membranes són sòlides, bé poroses o no poroses. En el cas de membranes poroses els processos de separació/extracció tenen lloc per difusió i en el cas de membranes no poroses, l'intercanvi entre les dues fases és per solubilització selectiva del producte a separar, en el material de la membrana.

El procés de separació mitjançant membranes pot tenir lloc també a través de membranes líquides que permeten solucionar alguns dels inconvenients de les membranes sòlides. Per exemple, la solubilitat selectiva i el coeficient de difusió de les substàncies a separar, són molt més grans en les membranes líquides que en les membranes sòlides. Així l'estructura pròpia de tres fases de les emulsions múltiples permet el seu ús com a membranes líquides.

En un sistema tipus W/O/W, la membrana correspon a la fase oliosa i si el sistema fos O/W/O, la membrana correspondria a la fase aquosa.

En la literatura científica actual un dels sistemes que inclouen membranes líquides es coneixen amb les sigles ELM ("*Emulsion Liquid Membrane*"), concepte introduït per Li en una patent de 1968. La membrana líquida d'un gruix de una micra aproximadament i similar a una bombolla de sabó correspon a la fase intermèdia d'una emulsió múltiple. A través de la membrana líquida emigra el component a extreure (*Li, 1968*). Aquest component es troba inclòs en la fase externa i difon a la fase interna del sistema. Per aquest motiu alguns autors afirmen que les emulsions múltiples poden ser considerades com a sistemes de membrana líquida, jugant un paper de membrana dialitzant i difonen a través seua substàncies essencialment immiscibles en ella (*Seiller i cols., 1987*).

Els processos basats en ELM han estat comercialitzats en nombroses aplicacions (*Cahn i cols., 1998*). En aquest sentit les aplicacions de les emulsions múltiples que trobem a la bibliografia actual es basen en el tractament d'aigües residuals i en la separació de metalls pesants. Les emulsions múltiples per aquesta finalitat només són estables durant el procés de refinat i permeten purificacions de gran qualitat (*Rocha-Filho i cols., 1989*). El producte extret i difós cap a la fase externa és transformat per reacció química amb algun component específic de la fase interna, el que provoca que quedi retingut en ella, ja que perd la seua capacitat de difondre (*Davis, 1981*).

Un bon exemple d'aplicació de les membranes líquides és l'ús d'una emulsió múltiple W/O/W per extreure àcids orgànics d'aigües residuals (*Li i cols., 1971*) així com la separació d'hidrocarburs en una emulsió O/W/O (*Cahn, 1988*). També *Li i cols* en 1972 utilitzen una emulsió múltiple W/O/W per tractar aigües residuals. Altres exemples més recents són la separació de Crom (VI) i Coure (II) en una emulsió múltiple W/O/W continguda en una simulació d'aigües residuals (*Chakravarti i cols., 1995, 2000*).

### 1.3 LA PELL. ANATOMIA, FISIOLOGIA I FUNCIONS.

#### SISTEMES DE TRANSPORT CUTANI.

La pell és l'òrgan del cos humà més gran i visible, i pateix un procés d'envelliment que es presenta en múltiples manifestacions i problemes (*Fore, 2006*). La pell és una membrana gruixuda, amb diverses estructures annexes, que recobreix la superfície del cos. Això, no obstant, no pot ésser considerada un simple embolcall corporal, perquè li corresponen funcions diverses i variades que la converteixen en un òrgan més de l'organisme. Entre d'altres funcions més rellevants, destaca la protecció del cos davant diversos agents externs, com també la participació activa en la regulació de la temperatura corporal i, fins i tot, en la regulació del medi intern. D'altra banda, la pell ha d'ésser considerada un òrgan sensorial, perquè s'hi localitza el sentit del tacte i detecta diverses sensacions com el fred o l'escalfor (*Ferrándiz, 1989*).

La pell recobreix la superfície de l'organisme i continua, als orificis naturals, amb les mucoses. Es compon de tres capes de teixits diferenciats, de la qual la més externa és l'anomenada epidermis, la mitjana dermis i la més profunda l'hipodermis (Fig. 21). En conjunt, és el òrgan més important tant en superfície com en pes del cos humà, constitueix una membrana gruixuda, resistent i flexible que en la persona adulta té una superfície aproximada de 2 m<sup>2</sup>, i pesa 4,5-5 kg., aproximadament el 7% del pes corporal total. El seu gruix varia entre 0,5 mm en les parpelles fins a 4 mm en el taló, però en gran part del cos el gruix mesura 1-2 mm (*Tortora i cols., 2014*).

En la pell es localitzen els anomenats annexes cutanis, unes estructures formades per cèl·lules diferenciades que realitzen funcions específiques. Els principals annexes cutanis són les glàndules sudorípares, les glàndules sebàcies i els fol·licles pilosos que formen els pèls i les ungles.

També s'hi troben nombrosos vasos sanguinis per on circula la sang que nodreix les cèl·lules. Igualment hi ha fibres nervioses algunes de les quals són sensibles i d'altres regulen les funcions dels diversos elements que la componen (Fig. 21).

#### 1.3.1 Anatomia de la Pell

Des d'un punt de vista morfològic, la pell humana és un òrgan estructuralment complex on es poden distingir tres capes estretament lligades i interconnectades entre si:

- Epidermis (la capa més externa i visible)
- Dermis (formada per teixit connectiu)
- Hipodermis (Teixit subcutani adipós)

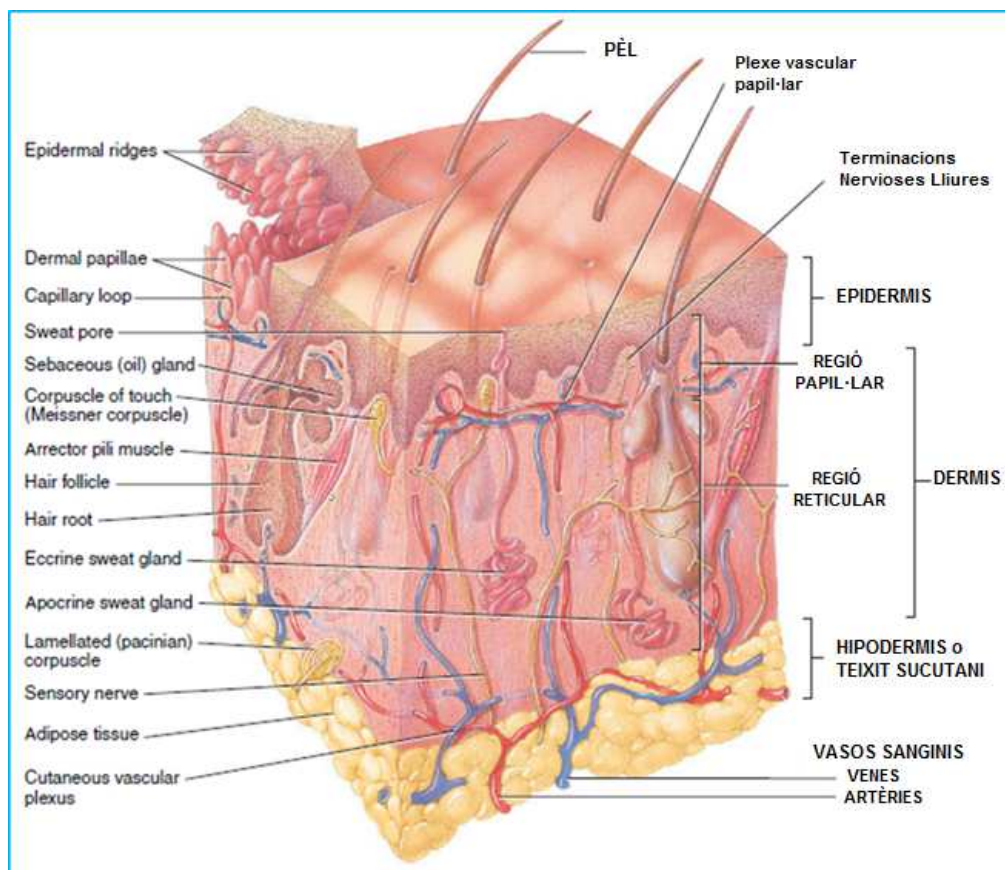


Figura 21: Vista en secció de la pell i el teixit subcutani (segons Tortora i cols., 2014).

La part més superficial composta de teixit epitelial és la epidermis i la part més profunda composta de teixit connectiu és la dermis. Mentre que la epidermis és no-vascular, la dermis és vascular. Per aquesta raó, durant un tall superficial a la pell no hi ha sangrat, en canvi, un tall més profund que penetra a la dermis sí que produeix sangrat (*Tortora i cols., 2014*). La capa més profunda, la hipodermis i/o teixit subcutani, consta de teixit areolar i adipós. Aquest teixit subcutani serveix com un dipòsit d'emmagatzematge de greix i conté grans vasos sanguinis que subministren la pell<sup>25</sup>.

1- Epidermis: És la capa més superficial. Està formada per teixit estratificat escamós i conté quatre tipus de cèl·lules diferenciades (Fig. 22). Mesura entre 0.04 mm i 1.6 mm depenent de la zona del organisme:

- Queratinòcits: són el 90% de les cèl·lules epidèrmiques. Aquestes són responsables de formar la queratina. La queratina és una proteïna fibrosa que ajuda a protegir la

<sup>25</sup> Molts autors no reconeixen la hipodermis o el teixit subcutani com a capa pròpia de la pell juntament amb dermis i epidermis (*Tortora i cols., 2014*). Altres autors descriuen la hipodermis com una capa de la dermis (*Palmer i cols., 2016*).

pell i els teixits subjacents d'abrasions, calor, microbis i substàncies químiques. Els queratinòcits també produeixen uns grànuls laminars, que alliberen una substància que disminueix l'entrada i pèrdua d'aigua i inhibeix l'entrada de materials estranys. Els queratinòcits també produeixen citoquines en resposta al dany tissular (*Venus i cols., 2011*).

- Melanòcits: corresponen a un 8% de les cèl·lules epidèrmiques. Produeixen un pigment anomenat melanina, de color negre-marronós, que contribueix a donar color a la pell i a absorbir els raigs ultraviolats (UV).
- Cèl·lules de Langerhans: aquestes cèl·lules es produeixen a la medul·la òssia i migren cap a l'epidermis. Participen en la resposta immunitària enfront els microbis que envaeixen la pell i són fàcilment danyades per les radiacions UV.
- Cèl·lules de Merkel: aquestes cèl·lules estan localitzades a la capa més profunda de l'epidermis, l'estrat basal. Aquestes tenen un paper important en la transmissió de les sensacions cutànies.

Les diferents capes que componen l'epidermis són les següents, des de la més profunda a la més superficial (Fig. 21-25):

- a) Estrat basal: Està representat per una única capa de cèl·lules que conté cèl·lules mare o "stem cells" que tenen una capacitat reproductora constant. Les cèl·lules mare per mitosi originen cèl·lules noves anomenades queratinòcits. Per aquesta raó, l'estrat basal també s'anomena estrat germinatiu. Les cèl·lules són petites i de forma cuboide. Cada vegada que una cèl·lula de l'estrat basal es reproduïx, es genera una altra cèl·lula que desplaça a la resta a un nivell més superficial. Igualment les noves cèl·lules que es formen van empenyent les que són al damunt i les fan pujar de nivell. En aquest procés les cèl·lules passen a formar part de les altres capes cel·lulars epidèrmiques. Estan en contínua renovació i això possibilita el manteniment epidèrmic, és a dir, un recanvi cel·lular, que és la suma entre la renovació i la descamació. També hi ha la presència de melanòcits que constitueixen entre 5-10% del contingut cel·lular de l'estrat basal (*Venus i cols., 2011*)

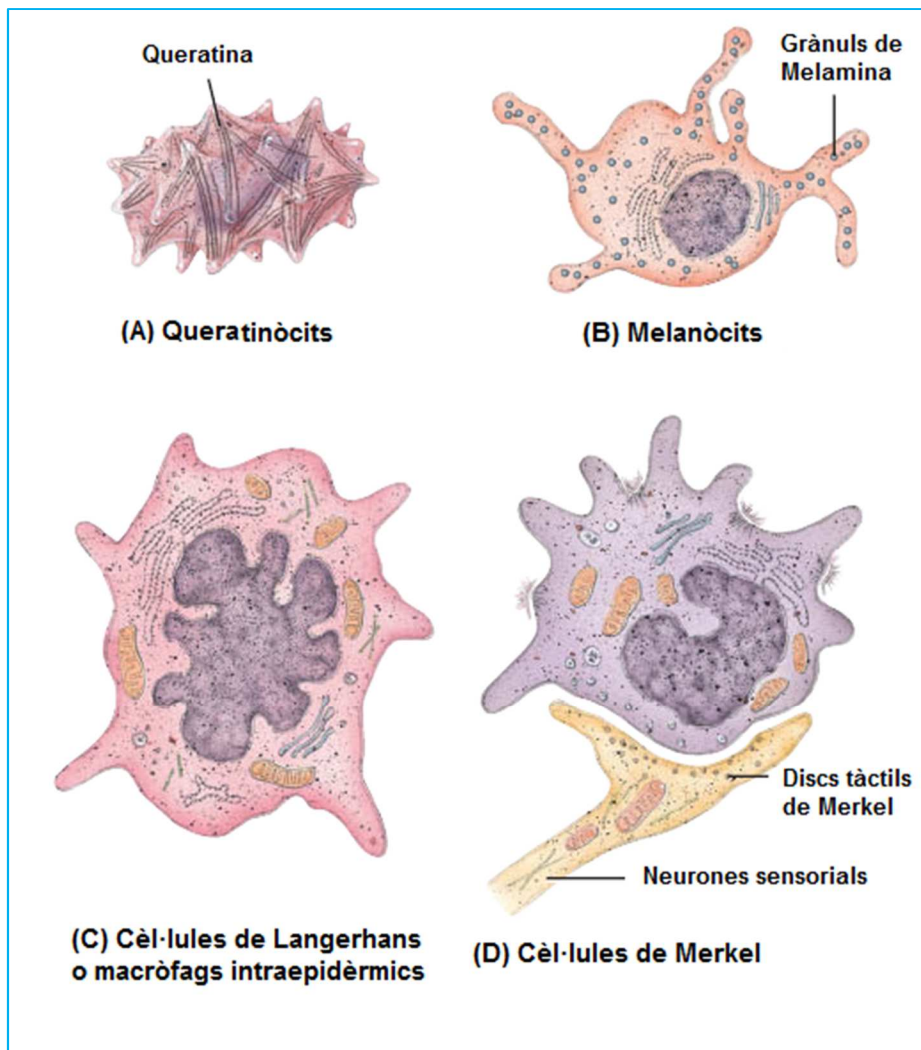


Figura 22: Principals tipus de cèl·lules contingudes en l'epidermis: (a) Queratinòcits (b) Melanòcits (c) Cèl·lules de Langerhans (d) Cèl·lules de Merkel (segons *Tortora i cols., 2014*).

- b) Estrat espinós: Format per 8 o 10 capes de queratinòcits, que s'uneixen entre si a través d'unes prolongacions o espines anomenades desmosomes. A mesura que les cèl·lules maduren i avancen cap a la superfície es tornen més planes. També hi ha la presència de Cèl·lules de *Langerhans* i melanòcits.
- c) Estrat granulós: Format per 3 o 5 capes de cèl·lules de queratinòcits. Aquestes cèl·lules contenen abundants grànuls de queratohialina (precursor de la queratina). La queratina és una proteïna que forma part de les capes més externes de l'epidermis. La queratina forma una barrera que protegeix les capes més profundes de ferides i invasions microbianes, i fa la pell impermeable davant la entrada i sortida d'aigua.

- d) Estrat transparent o *stratum lucidum*: Només està present als palmells de la mà, les puntes dels dits i a les plantes dels peus. Consisteix en fileres de 4 a 6 queratinòcits transparents, aplanats i morts que contenen grans quantitats de queratina.
- e) Estrat corni: És la capa més externa de l'epidermis. Està compost entre 25 i 30 capes de cèl·lules aplanades i mortes completament plenes de queratina. Aquestes cèl·lules contínuament es desprenen i són reemplaçades per cèl·lules de capes més internes. Les seves múltiples capes de cèl·lules mortes ajuden a l'estrat corni a protegir les capes més profundes d'una lesió i la invasió microbiana. La constant exposició de la pell a la fricció estimula l'augment de la producció cel·lular i la producció de queratina que resulta en la formació d'un call, és a dir, un engruiximent anormal de l'estrat corni.

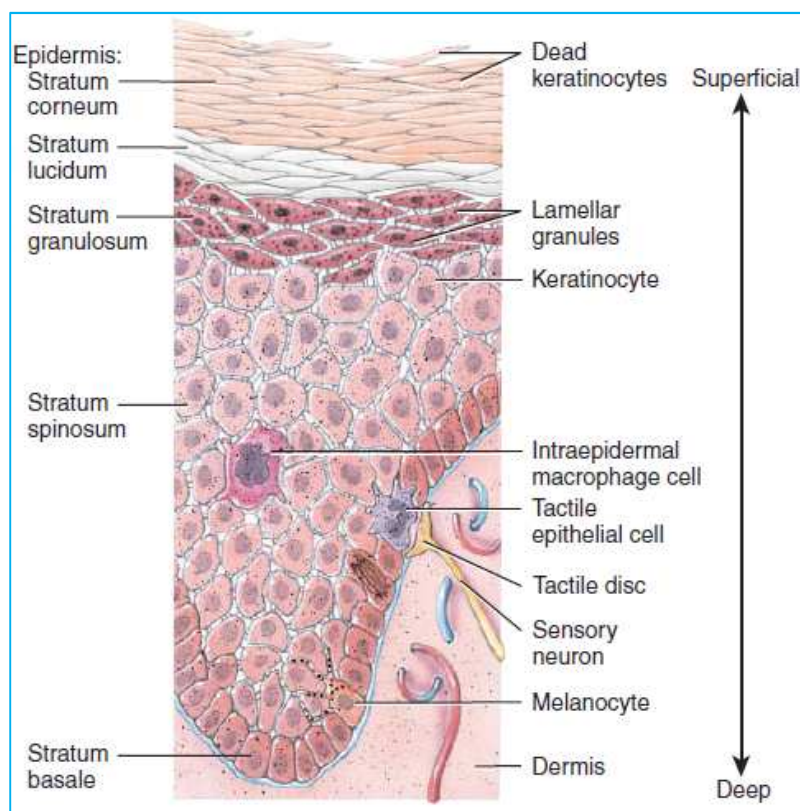


Figura 23: Localització de les principals cèl·lules epidèrmiques (segons *Tortora i cols., 2014*).

En el procés de queratinització, les noves cèl·lules formades a les capes basals experimenten un procés de desenvolupament essent empeses cap a la superfície. Així, durant el trajecte van acumulant queratina, mentre que al mateix temps desapareix el citoplasma, nucli i altres òrgans, i la cèl·lula mor. Amb el temps la cèl·lula queratinitzada es desprèn i és reemplaçada per les cèl·lules de la capa inferior que es va queratinitzant. Tot

el procés des de que es forma una cèl·lula a l'estrat basal fins que surt a la superfície, queratinitzada, i es desprèn, té lloc entre 4-6 setmanes en una epidermis mitjana de 0.1 mm (Tortora i cols., 2014).

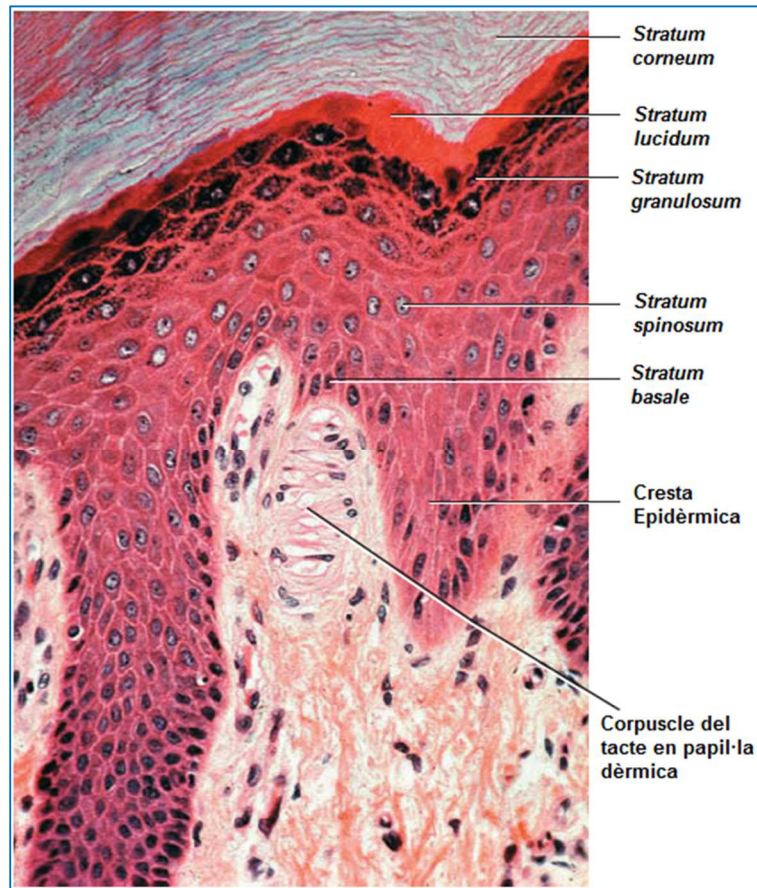


Figura 24: Vista en secció de les principals capes de l'epidermis a 250X (segons Tortora i cols., 2014).

2- Dermis: És la capa de la pell que es troba entre l'epidermis i la hipodermis, i en depenen sobretot la resistència i la flexibilitat de la pell. Mesura entre 0.3 mm i 3.0 mm depenent de la zona del organisme. És una capa molt més gruixuda que l'epidermis, i aquest gruix varia d'una regió a una altra en el cos, aconseguint el seu major gruix en els palmells i les plantes. Aquesta capa està formada per una regió papil·lar i una regió reticular. La regió capil·lar és una porció superficial de la dermis, que representa una cinquena part del gruix total de la tota la capa, composta de teixit connectiu formada per fibres de col·lagen i fibres elàstiques. Les papil·les dèrmiques alberguen els vasos sanguinis. Aquestes també contenen, corpuscles del tacte (o corpuscles de *Meissner*) i les terminacions nervioses lliures que són responsables de la sensibilitat al tacte. Altres papil·les dèrmiques poden contenir diferents terminacions nervioses lliures que són les encarregades de les senyals que donen lloc a sensacions de calor, fredor, dolor, pessigolleig i picor.



La regió reticular, la part més profunda de la dermis, unida al teixit subcutani, consisteix en teixit connectiu amb importants gruixos de col·lagen i algunes fibres elàstiques. En els espais entre les fibres hi trobem algunes cèl·lules adiposes, els fol·licles pilosos, nervis, glàndules sebàcies i glàndules sudorípares. Les fibres de col·lagen a la regió reticular estan disposades en forma de xarxa i tenen una disposició més regular que les de la regió papil·lar. L'orientació més regular de les fibres de col·lagen ajuda a la pell a la resistència durant l'estirament. Els vasos sanguinis, nervis, fol·licles pilosos, glàndules sebàcies, i sudorípares ocupen els espais entre les fibres. La combinació de fibres de col·lagen i elàstiques en la regió reticular proporciona a la pell força, extensibilitat, capacitat d'estirament, i elasticitat. Aquesta capacitat d'extensibilitat de la pell es pot veure fàcilment al voltant de les articulacions i durant l'embaràs i l'obesitat (*Tortora i cols., 2014*).

L'espai que queda entre les cèl·lules i les fibres de la dermis és ocupat per la substància intersticial, d'una composició química complexa. Entre els seus components més abundants hi ha els mucopolisacàrids com l'àcid hialurònic, format per proteïnes i hidrats de carboni. A través de la substància intersticial, l'oxigen i les substàncies nutritives provinents dels vasos sanguinis difonen cap a les cèl·lules de la dermis i l'epidermis.

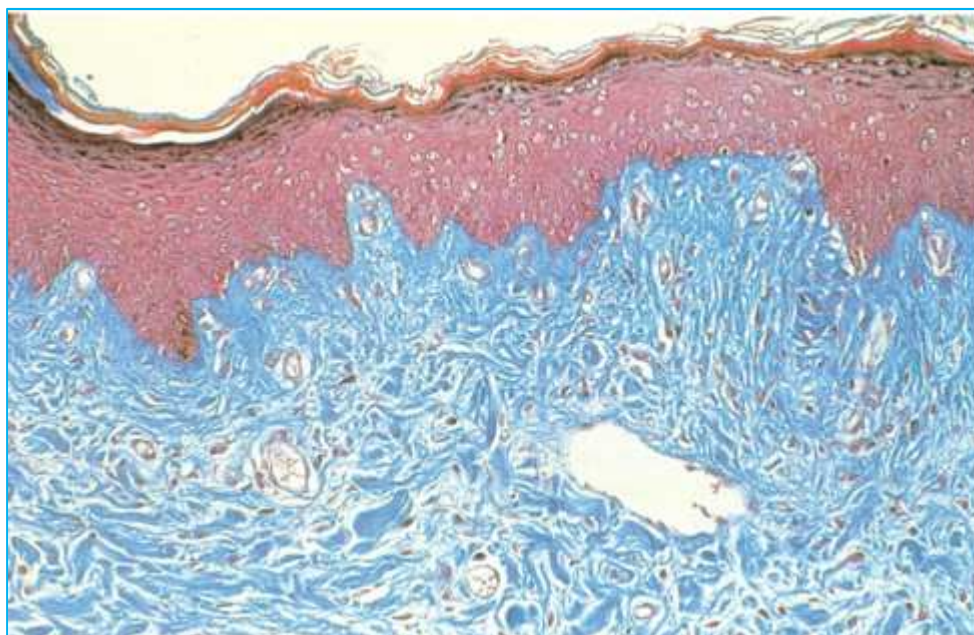


Figura 25: Tall de pell vist al microscopi que permet diferenciar l'epidermis de la dermis i observar les fibres de col·làgenes tenyides de color blau (Ferrándiz, 1989).

- 3- Hipodermis: anomenat teixit subcutani, és la capa més profunda de la pell i s'uneix als teixits subjacents. Aquesta unió és laxa i permet el lliscament de la pell sobre els òrgans que recobreix. L'hipodermis es compon bàsicament de cèl·lules de greix o adipòcits caracteritzades per la capacitat de sintetitzar i emmagatzemar greixos. De fet, el greix

contingut en els adipòcits constitueix la principal font de reserva energètica de l'organisme. A més, l'hipodermis actua com encoixinat de la superfície del cos i proporciona aïllament tèrmic (*Tortora i cols., 2014*).

### 1.3.2 Fisiologia de la Pell

Ara que es té una comprensió bàsica de l'estructura de la pell, es pot apreciar millor les seves múltiples funcions. Entre les nombroses funcions de la pell s'inclouen la termoregulació, funció protectora, funció sensorial, funció excretora i d'absorció, l'emmagatzematge de la sang i la síntesi de la vitamina D (*Tortora i cols., 2014*).

- **Funció homeostàtica o regulació de la temperatura corporal:** En resposta a elevades temperatures ambientals o a un exercici físic dur, l'evaporació de la suor de la superfície de la pell ajuda a disminuir una elevada temperatura corporal i canviar-la a una normal. En canvi, en resposta a baixes temperatures ambientals, la producció de suor disminueix, cosa que ajuda a conservar la calor. Canvis en la pressió sanguínia de la pell ajuden també a regular la temperatura corporal.
- **Funció protectora:** La pell cobreix el cos i el proveeix d'una barrera física que protegeix les capes de teixits inferiors de l'abradió física, invasió bacteriana, deshidratació i radiació ultraviolada (UV).
- **Funció sensorial:** La pell conté un abundant nombre de terminacions nervioses i receptors (Corpuscles de *Meissner*, Cèl·lules de *Merkel*) que detecten els estímuls relacionats amb la temperatura, tacte, pressió, vibració i dolor. És a dir, proporcionen informació relacionada amb els estímuls externs.
- **Funció excretora i d'absorció:** A través de les glàndules sudorípares, a més d'eliminar calor i aigua del cos, la transpiració és un vehicle per eliminar petites quantitats de sal i alguns components orgànics. L'absorció de substàncies solubles en aigua a través de la pell és pràcticament insignificant, però determinades substàncies liposolubles poden penetrar a la pell. Aquestes inclouen les vitamines liposolubles (A, D, E i K), certs medicaments, els gasos oxigen i diòxid de carboni. Materials tòxics que poden ser absorbit per la pell inclouen dissolvents orgànics tals com acetona i tetraclorur de carboni; sals de metalls pesants com el plom, el mercuri i arsènic.
- **Reservori sanguini:** La dermis està formada per una extensiva xarxa de vasos sanguinis que transporten del 8 al 10% de la sang total d'una persona adulta. Per això la pell és considerada com un reservori de sang.

- Síntesi de vitamina D: La síntesi de vitamina D comença amb l'activació d'una molècula precursora anomenada calcitriol, que es troba a la pell, a través dels raigs ultraviolats (UV) de les radiacions solars. A continuació els enzims del fetge i els ronyons, modifiquen aquest precursor produint la molècula activa calcitriol, la forma més activa de la vitamina D. El calcitriol és una hormona que ajuda a l'absorció del calci dels aliments del tracte gastrointestinal a la sang. Només una petita quantitat de exposició a la llum UV (uns 10 a 15 minuts com a mínim dues vegades a la setmana) es requereix per a la síntesi de vitamina D. Les persones que eviten l'exposició al sol i les persones que viuen en climes més freds del nord, per evitar la deficiència de vitamina D poden requerir suplementes de vitamina D. La majoria de les cèl·lules del sistema immune tenen receptors de vitamina D, i les cèl·lules activen la vitamina D en resposta a una infecció, especialment en infeccions respiratòries, com la grip. La vitamina D és creu que millora l'activitat fagocítica, augmentant la producció de substàncies antimicrobianes en els fagòcits, regula la funció immunitària i ajuda a reduir la inflamació.

### 1.3.3 La Pell com via d'administració de Fàrmacs

La pell ha estat considerada clàssicament com una membrana impermeable entre el cos i el medi extern. Es una barrera auto reparable que protegeix l'organisme en front atacs químics, físics, microbians i radiològics. Compleix a més, una funció homeostàtica de control de la temperatura i humitat corporal (*Williams i cols., 1992*).

L'ús potencial de la pell com via d'administració de fàrmacs generalment s'ha concebut com l'aplicació tòpica en el lloc on són requerits (*Chien i cols., 1994*). Fins fa unes dècades, el disseny de les formulacions d'aplicació tòpica considerava la pell com una mena d'estructura protectora enfront substàncies exògenes i una eventual absorció sistèmica de fàrmac per aquesta via s'entenia com un efecte advers o indesitjable. Però, les investigacions al voltant de la permeabilitat cutània ha posat de manifest que, amb l'ús de tècniques de formulació adequades, la pell pot utilitzar-se tant per tractaments locals com sistèmics. Actualment la possibilitat d'utilitzar la pell com via d'alliberació de fàrmacs va més enllà del límit de l'aplicació local, així que constitueix a més una alternativa per aconseguir efectes sistèmics. Així doncs, les formulacions administrades sobre la pell es poden classificar en dos grans grups segons la seva diana terapèutica. D'una banda es pot aconseguir una absorció sistèmica del fàrmac, el que s'anomena administració transdèrmica, o bé una acció local circumscriu al lloc d'aplicació, el que s'anomena administració local (*Boix i cols, 2013*).

Per els sistemes transdèrmics, l'objectiu en el disseny de la dosificació és maximitzar el flux a través de la pell fins a la circulació sistèmica i simultàniament minimitzar la retenció i el metabolisme del fàrmac en la pell. En contrast, les formes d'aplicació tòpica es pretén, en

general, minimitzar el flux del fàrmac a través de la pell maximitzant en temps de retenció en la mateixa (Dean, 1994). De totes maneres tant els sistemes transdèrmics com els sistemes d'administració tòpica, el fàrmac penetra a través del estrat corni, la capa més externa de la pell. En aquest sentit, considerem l'increment de la penetració del fàrmac a través del estrat corni així com el increment de la retenció del fàrmac en el estrat corni i/o epidermis quan es desenvolupa un sistema d'alliberació tòpica de fàrmacs. El metabolisme del fàrmac en la pell també hauria de ser minimitzat.

#### 1.3.4 Permeació Cutània

##### 1.3.4.1 Vies de Penetració a través de la pell

El subministrament de fàrmacs a través de la pell segueix sent un repte per la comunitat farmacèutica i per els formuladors galènics. Això és en gran part, a causa de les excel·lents propietats de barrera d'aquest òrgan que ha evolucionat per permetre als humans sobreviure en un ambient sec. Tot i que la pell és un teixit de múltiples làmines, és la capa més externa, l'estrat corni (SC) que comprèn la barrera més important a la permeació de principis actius (Lane, 2013).

El mecanisme de transport de substàncies actives a través de la pell segueix un procés de difusió passiva, de forma que les molècules de fàrmac van a favor d'un gradient de concentració, passant del compartiment en el que es troben en més concentració al menys concentrat.

La magnitud i velocitat d'aquest transport estan governats per la Llei de Fick. Existeixen dues possibles vies per a la penetració transdèrmica: la primera a través dels apèndixs o via transpedicul·lar (fol·licles pilosos, glàndules sudorípares o sebàcies) i la segona, a través de l'epidermis (via intracel·lular i intercel·lular) (Fig. 26).

- a) Via transpedicul·lar o Apèndixs: El pas a través dels apèndixs es realitza a través de les glàndules sudorípares i fol·licles pilosos, resultant superior a través de fol·licles. No està considerada una via de penetració significant ja que els fol·licles pilosos i glàndules sudorípares ocupen solament el 0,1% del àrea total de la pell (Tregear, 1966; Scheuplein, 1967). No obstant això, l'administració de fàrmacs a través d'aquesta ruta pot ser important per a la permeació de compostos que es difonen lentament a través de l'estrat corni, polars i d'alt pes molecular, com ara nanopartícules (Lademann i cols., 2011).
- b) Epidermis: El pas de l'actiu a través de l'epidermis és el procés majoritari i depèn de les seves propietats fisicoquímiques (pKa, pes molecular, solubilitat, coeficient de repartiment, etc). També tenen influència el metabolisme, el gruix de l'estrat corni, de la hidratació de la pell i els excipients del vehicle utilitzat.

- Via intracel·lular o transcel·lular: consisteix en el pas de l'actiu a través de les cèl·lules de l'epidermis (*Ritschel i cols., 1988*) i és la via més utilitzada per les molècules hidròfiles o polars.
- Via intercel·lular consisteix en el pas de l'actiu entre les matrius lipídiques del estrat corni. És la via més utilitzada per les molècules lipòfiles. Aquesta ruta en estudis experimentals s'ha vist que és la ruta predominant (*Lane, 2003*). La longitud de la trajectòria de difusió s'ha trobat per ser molt més llarga que el gruix del SC (20 µm) i s'estima al voltant de 300-900 µm. El transport de molècules a través d'aquesta ruta implica la difusió seqüencial i partició entre els cap polars i les cadenes alquíliques del espai lipídic intercel·lular (*Albery i cols., 1979; Bodde i cols., 1989*).

Les molècules que tenen caràcter amfifílic poden usar ambdues vies.

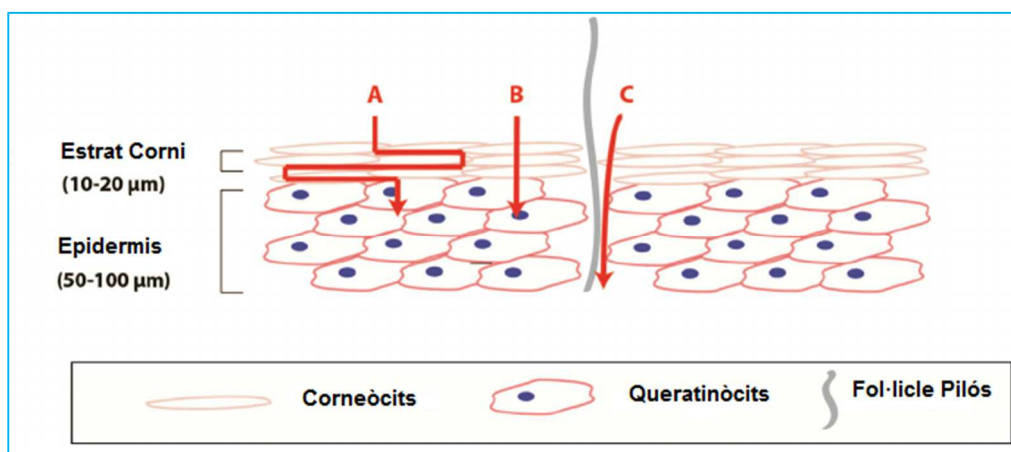


Figura 26: Esquema amb les principals vies de penetració de la pell a través estrat corni: (A) Via Intercel·lular (B) Via intracel·lular (C) Via transpedicul·lar.

#### 1.3.4.2 Procés de Permeació Cutània

L'absorció de fàrmacs a través de la pell és un procés complex en el que es distingeixen varies etapes. El fàrmac travessa estrat corni, entra en contacte amb l'epidermis i per últim si arriba en quantitat suficient a la dermis, es pot incorporar a la circulació general. El procés de permeació cutània pot dividir-se en tres etapes: penetració, permeació i absorció (*Boix i cols, 2013*).

1. Penetració: Indica l'entrada de qualsevol substància en una capa determinada o en algun òrgan. Perquè es produeixi la penetració es necessita, en primer lloc, que s'alliberi l'actiu del vehicle que el conté. Aquest actiu ha de dissoldre's, o bé ha d'estar dissolt

(dissolució), i difondre cap a la interfase vehicle-estrat corni. En aquesta primera fase la formulació galènica serà molt important donat que modularà el procés d'alliberació de l'actiu.

2. Permeació: Aquesta segona etapa està influenciada per un procés de difusió de l'actiu a través de la pell. La principal barrera que troben els actius per travessar la pell és l'estrat corni (*Boix i cols, 2013*). Existeixen tres rutes principals del pas d'actius a través de l'estrat corni (Fig. 26) tal com s'ha exposat anteriorment.
  - Transapendicular
  - Transcel·lular o intracel·lular
  - Intercel·lular
3. Absorció: És el pas de la substància al sistema circulatori (vasos sanguinis o vasos limfàtics) (*Boix i cols, 2013*).

En aquest sentit *Majella Lane (2013)* esquematitzen molt didàcticament les etapes que esdevenen durant la administració d'un preparat d'aplicació tòpica sobre la pell segons mostra la Figura 27. L'alliberament d'un fàrmac contingut en una formulació dermatològica sobre la superfície de la pell i el seu transport a la acció local i/o circulació sistèmica és un procés de múltiples etapes. Inicialment, el fàrmac ha de ser alliberat del vehicle seguit de la partició en el SC. Les molècules posteriorment es difonen (com a resultat d'un gradient de concentració) a través del SC abans d'un procés de partició en l'epidermis viva, i a més una difusió a través de l'epidermis viva cap a la dermis. Els vasos limfàtics i la vascularitat de la dermis, clarificarà el medicament de la pell. Aquest procés és eficient i, essencialment, produeix una concentració activa molt baixa en les capes de la pell per sota el SC. Un nombre de fàrmacs pot interactuar amb les diferents capes de la pell en el curs de la penetració percutània, el que resulta una absorció limitada. Aquestes interaccions que poden ser reversibles/irreversibles s'uniran a diverses estructures en els teixit biològic, com ara la queratina del SC i/o llocs específics de la pell per produir una resposta fisiològica (per exemple, activitat terapèutica o reacció al·lèrgica).

Per tant, un fàrmac candidat ideal hauria de tenir suficient lipofília per repartir-se per l'estrat corni, però també suficient hidrofília per permetre el segon pas de partició en l'epidermis viva i eventualment la circulació sistèmica. Per a la majoria de fàrmacs, excepte aquells que són molt lipòfils, el pas determinant de la velocitat per al transport del fàrmac a través de la pell és el trànsit a través de l'estrat corni (*Kalia i cols., 2001*).

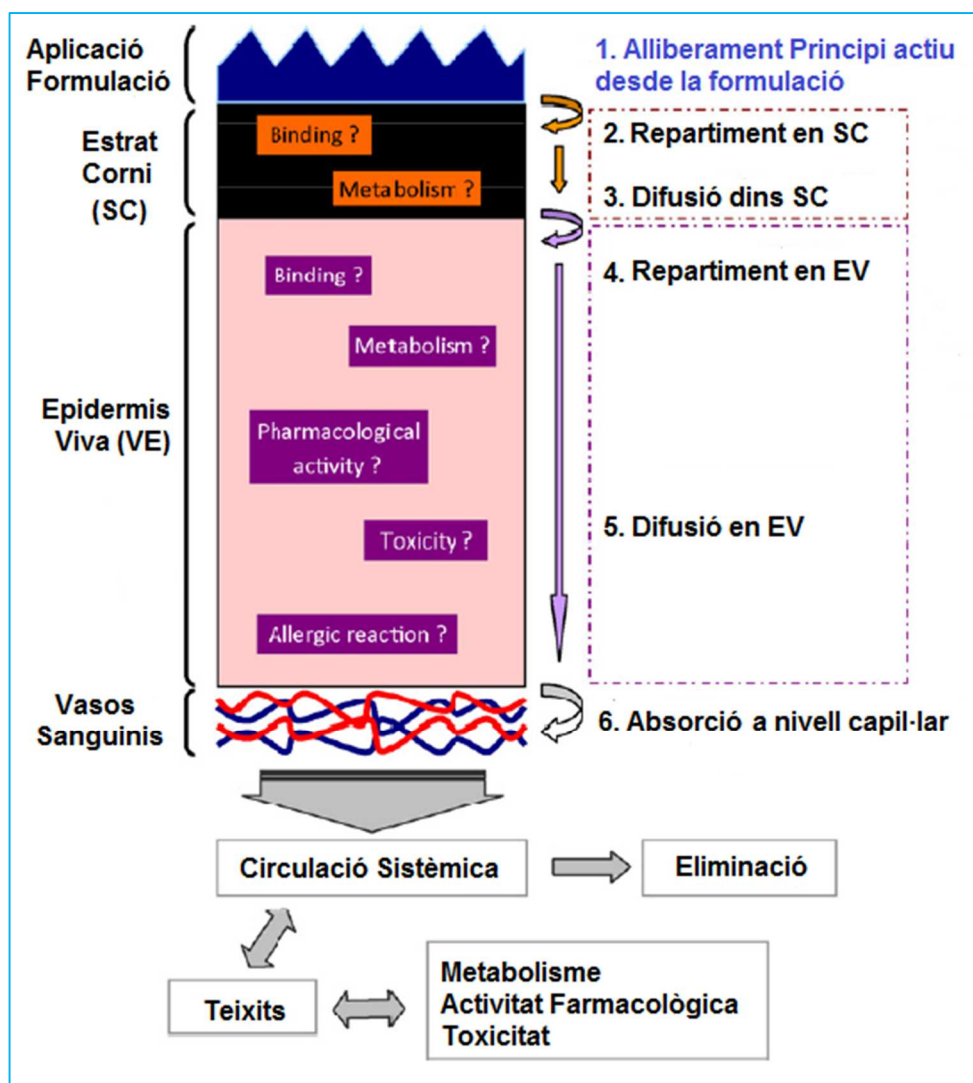


Figura 27: Representació esquemàtica dels processos implicats en el transport de fàrmacs a través de la pell de qualsevol formulació tòpica o transdèrmica (segons Lane, 2013).

### 1.3.3.1 Cinètica de la Permeació cutània

El fenomen de permeació d'un actiu a través de la pell és un procés complex en el qual influeixen gran quantitat de factors. Vindrà limitat per la difusió de l'actiu a través de l'estrat corni (Chien, 1982), donat que aquest actua com a medi de difusió passiva, a través del qual les molècules penetrants migren un cop dissoltes en el vehicle seguint les Lleis de Fick de la difusió (Michaels, 1975).

Com és conegut, la difusió passiva és un procés en el qual la matèria es transporta d'una regió d'un sistema a una altra, a favor de gradient de concentració d'acord amb un moviment aleatori de molècules. Aquest moviment aleatori posseeix una direcció preferencial, des de

la regió de concentracions elevades cap a la regió de concentracions menors, tractant-se d'un procés espontani i irreversible.

Aquest procés de difusió ve descrit per la primera *Llei de Fick*, la pell pot considerar-se com una membrana complexa en la qual la quantitat de substància ( $M$ ) que difon a través d'una determinada àrea ( $S$ ) per unitat de temps  $t$  és conegut com a flux ( $J$ ) i la seva expressió matemàtica és (*Fick, 1855*):

$$J = \frac{dM}{Sdt} \quad (\text{Eq. 1})$$

El flux serà proporcional al gradient de concentració  $dC/dX$ , és a dir:

$$J = -D \frac{dC}{dX} \quad (\text{Eq. 2})$$

On  $J$  és el flux de solut a través de la membrana i per unitat de superfície (mols/s.cm<sup>2</sup>, o g/s.cm<sup>2</sup>);  $D$  és el coeficient de difusió de la molècula penetrant (expressat en cm<sup>2</sup>/s);  $C$  la seva concentració (g/ml) i  $X$  és la distància que recorre la matèria perpendicular a la membrana. El signe menys indica que el flux es mou en el sentit de disminuir la diferència de concentracions, és a dir, direcció cap a la zona més diluïda.

En els estudis de permeació transdèrmica s'estudia normalment la variació de la concentració d'actius en funció del temps per a una zona concreta del sistema. L'equació que explica les variacions temporals de concentració d'actiu en una zona localitzada de la membrana es coneix com la segona *Llei de Fick*, la seva equació deriva de l'equació 1.

La concentració de l'actiu contingut en un determinat volum de pell, només canvia com a resultat del flux net de difusió de les seves molècules des de dins cap a fora de la zona considerada. La diferència de la concentració en el volum de referència és conseqüència de la sortida i entrada de solut (veure Figura 28).



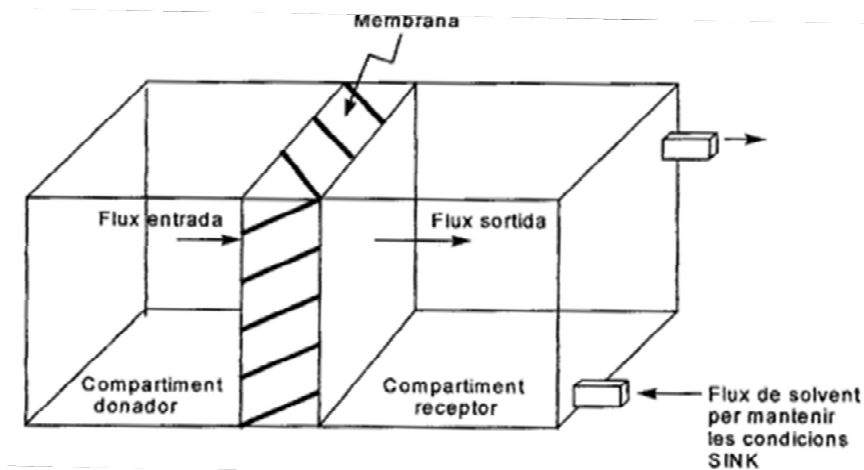


Figura 28: Model de difusió entre dos compartiments a través d'una membrana.

Els canvis de concentració de solut en el volum considerat en funció del temps ( $dC/dt$ ) i el flux que difon de substància per unitat de distància recorreguda ( $dJ/dX$ ) s'expressa mitjançant l'equació següent:

$$\frac{dC}{dt} = -\frac{dJ}{dX} \quad (\text{Eq. 3})$$

Diferenciant l'equació de la primera *Llei de Fick* (Eq.2) respecte a la  $X$ , obtenim:

$$\frac{dJ}{dX} = -D \frac{d^2C}{dX^2} \quad (\text{Eq. 4})$$

Substituint  $dC/dt$  de l'equació 3 en l'equació 4, s'obté l'expressió matemàtica de la segona *Llei de Fick* (Crank i cols., 1975):

$$\frac{dC}{dt} = -\frac{d^2C}{dX^2} \quad (\text{Eq. 5})$$

Aquesta expressió (segona *Llei de Fick*) estudia els estats en els quals els canvis de concentració de solut en funció del temps en una zona determinada són proporcionals als canvis de gradient en un punt del sistema. El valor  $D$  ve afectat per la temperatura, la pressió, les propietats del solvent i de la naturalesa química de les substàncies que difonen. No obstant, a la pràctica, el coeficient de difusió s'assumeix que té un valor constant.

Quan s'inicia el procés de permeació, la quantitat d'actiu en pell és poc significativa i en funció del temps augmenta fins arribar a la quantitat màxima de dissoldre's en el substrat. En aquestes condicions s'estableix un estat d'equilibri estacionari, és a dir, la quantitat

d'actiu permeat en funció del temps és constant. La primera *Llei de Fick* considera el flux (velocitat de difusió per unitat d'àrea) com un flux en estat d'equilibri estacionari i la segona *Llei de Fick* es refereix en general, als canvis de concentració d'actiu, en funció del temps durant el procés de permeació de la pell per qualsevol gruix,  $x$  quan el flux no es troba en estat d'equilibri estacionari.

Si es considera la difusió d'un actiu a través d'una àrea  $S$  de la pell d'un gruix  $h$  i a la vegada es consideren les concentracions d'actiu en la membrana en íntim contacte amb les solucions donadora i receptora, són  $C_1$  i  $C_2$  respectivament, d'acord amb la *Llei de Fick*, podem escriure:

$$J = \frac{dM}{Sdt} = -D \frac{C_1 - C_2}{h} \quad (\text{Eq. 6})$$

On  $(C_1 - C_2)/h$  és aproximadament  $dC/dX$

El gradient de concentració d'actiu en el sistema pot assumir-se constant per un pseudoestat d'equilibri estacionari.

L'equació 6 indica que la part externa (límit) de les capes aquoses (suposadament estàtica i immòbil) a ambdós costats de la pell, no afecten significativament al procés global de transport de l'actiu.

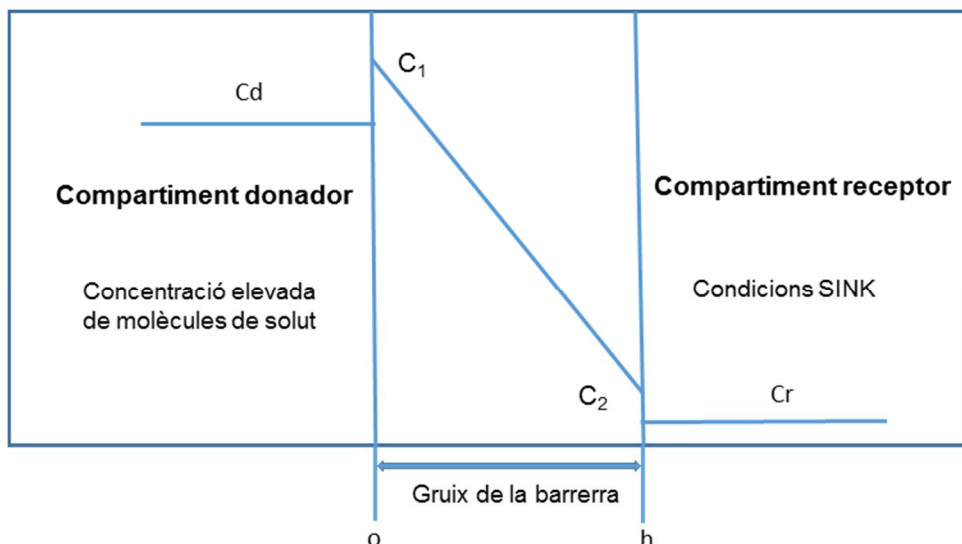


Figura 28: Model de difusió entre dos compartiments a través d'una membrana.

Les concentracions  $C_1$  i  $C_2$  d'actiu dins de la membrana normalment no són conegudes, però poden substituir-se pel producte del quocient de repartiment  $K$ , per la diferència de

concentracions d'actiu en el compartiment donador  $C_d$  i el compartiment receptor  $C_r$  (veure Figura 28).

El coeficient de repartiment  $K$  és igual a:

$$K = \frac{C_1}{C_d} = \frac{C_2}{C_R} \quad (\text{Eq. 7})$$

d'on:

$$K = \frac{C_1 - C_2}{C_d - C_R} \quad (\text{Eq. 8})$$

d'on:

$$C_1 - C_2 = K(C_d - C_R) \quad (\text{Eq. 9})$$

Substituint el valor de  $(C_1 - C_2)$  de l'equació 9 en l'equació 6, s'obté:

$$\frac{dM}{dt} = DSK \frac{C_d - C_R}{h} \quad (\text{Eq. 10})$$

Si es compleixen les condicions *SINK* en el compartiment receptor,  $C_r = 0$  llavors:

$$\frac{dM}{dt} = DSK \frac{C_d}{h} \quad (\text{Eq. 11})$$

o bé:

$$J = DSK \frac{C_d}{h} \quad (\text{Eq. 12})$$

Si tenim en compte la unitat de superfície ( $S=1$ ) l'equació 12 queda segons:

$$J = DK \frac{C_d}{h} \quad (\text{Eq. 13})$$

On  $D$ ,  $K$  i  $h$  són constants i configuren la constant de permeabilitat,  $Kp$ , el seu valor de la qual és:

$$Kp = \frac{DK}{h} \quad (\text{Eq.14})$$

La constant de permeabilitat ( $Kp$ ) i el flux ( $J$ ) són els paràmetres més representatius de les característiques de permeació d'un actiu quan el procés es desenvolupa en estat d'equilibri estacionari. En general, a nivell experimental, són difícils els càlculs dels valors de la constant de difusió d'un actiu ( $D$ ), del seu coeficient de repartiment entre el vehicle i la pell ( $K$ ), així com el gruix de la mateixa ( $h$ ).

Malgrat això, el càlcul de  $Kp$  és possible si es coneix l'àrea de la pell utilitzada en l'experiència ( $S$ ), la concentració d'actiu en el compartiment donador ( $C_d$ ) i la quantitat d'actiu permeada ( $M$ ) en el compartiment receptor, suposades les mateixes condicions "SINK". Dites condicions suposen que la concentració d'actiu en el compartiment receptor sempre és inferior al 15-20% de la seva concentració a saturació. En aquestes condicions, el valor de  $Kp$  es calcula a partir del pendent de la relació lineal entre la quantitat d'actiu permeada i el temps segons equacions 15 i 16..

Quan la concentració de solut en el compartiment donador és constant ( $C_0$ ), és a dir, en el pseudoestat d'equilibri estacionari, el valor del flux equival a:

$$J = Kp \times C_0 \quad (\text{Eq. 15})$$

I d'aquí es pot calcular la constant de permeabilitat segons::

$$Kp = \frac{J}{C_0} \quad (\text{Eq. 16})$$

Si considerem que s'ha arribat a l'estat d'equilibri estacionari, la quantitat de solut que travessa la membrana per unitat de temps ( $dM/dt$ ), és constant, fet que equival a considerar que el fenomen de difusió es desenvolupa d'acord amb un procés d'ordre zero. En aquestes condicions, segons l'equació 11, si s'assumeix que el coeficient de difusió de l'actiu ( $D$ ), la superfície de la pell ( $S$ ), el coeficient de repartiment de l'actiu entre el vehicle i la pell ( $K$ ), la concentració de solut en el compartiment donador ( $C_d$ ) i el gruix de la pell ( $h$ ) romanen constants durant l'experiència, pot simplificar-se de la següent manera:

$$\frac{dM}{dt} = K_1 \quad (\text{Eq. 17})$$

Per integració d'aquesta equació s'obté:

$$\int_M dM = k_1 \int_0^t dt \quad (\text{Eq. 18})$$

Que la seva resolució és :

$$M - M_0 = k_1(t - 0) \quad (\text{Eq. 19})$$

és a dir:

$$M = K_1 t + M_0 \quad (\text{Eq. 20})$$

Tenim en compte que a temps zero, la quantitat de fàrmac en el compartiment receptor és zero, l'equació 20 queda:

$$M = K_1 t \quad (\text{Eq. 21})$$

Aquesta és l'equació d'una recta que passa per l'origen i que relaciona la quantitat d'actiu permeada acumulada en funció del temps. El pendent de la recta ( $K_1$ ), constant de proporcionalitat entre la quantitat permeada acumulada d'actiu i el temps equival al flux ( $\text{mg} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$ ) si la quantitat s'expressa en mg, el temps en hores i la superfície en  $\text{cm}^2$ .

Coneixent així el valor del flux, i d'acord amb l'equació 15, pot estimar-se la constant de permeabilitat ( $K_p$ ), sabent  $C_0$  (la concentració d'actiu en el compartiment donador) (Eq.16).

El coeficient de permeabilitat o difusió  $D$  caracteritza la capacitat d'un determinat actiu per travessar la membrana (*Flynn i cols., 1998*). Per a una substància que difon a través de les diferents estructures de la pell, el coeficient de permeabilitat és el resultat dels diferents coeficients de permeabilitat per a cada un dels estrats que ha de travessar (estrat corni, epidermis i dermis) i que correspon a tres barreres diferents de difusió.

D'acord amb l'equació 6, el flux és proporcional al gradient d'activitat termodinàmica del solut per a la concentració a la que es troba. Aquesta activitat termodinàmica pot variar en funció del dissolvent i de la velocitat de difusió del solut a una determinada concentració. L'activitat termodinàmica d'un actiu pot considerar-se constant, per una determinada concentració si s'utilitza una concentració saturada.

En general, tant a nivell d'experiències de difusió *in vitro*, com en les formes de dosificació, l'activitat termodinàmica del solut, en les referides formes o en el compartiment donador no és constant a l'inici del procés encara que la concentració de solut romanguí constant. Això és degut a que transcorre un cert temps fins que la pell es troba saturada d'actiu, temps que dependrà de les característiques fisicoquímiques de l'actiu, en particular en el que respecte al seu coeficient de repartiment entre el vehicle i la pell ( $K$ ). Per aquest motiu, la representació gràfica entre les quantitats permeades acumulades de fàrmac i el temps no és una línia recta, sinó que en els primers temps és una corba convexa segons Fig. 29.

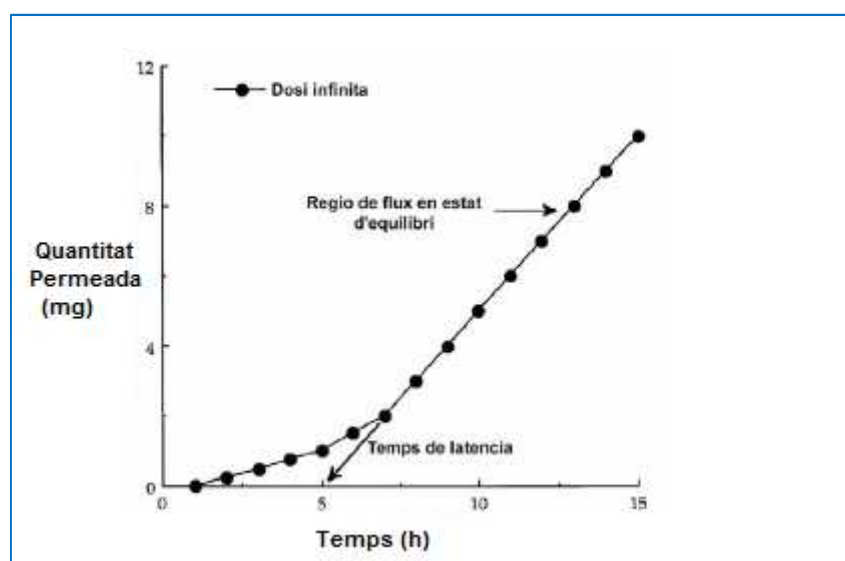


Figura 29: Representació de la funció de permeació simulada. Quantitat permeada acumulada en funció del temps,  $Q(t)$ , (Boix, 1997).

Pot observar-se que la corba és convexa en els primers temps del procés i després es transforma en lineal. Lògicament, això és degut a que en els primers temps no es troba en estat d'equilibri estacionari. En funció del temps, la velocitat de permeació és constant, la corba és pràcticament lineal i s'arriba a l'estat d'equilibri estacionari (veure Figura 29).

Si extrapolem la recta representativa del procés de permeació en estat d'equilibri estacionari fins a l'eix d'abscisses, el valor de la quantitat d'actiu permeada acumulada val zero, i el temps en el qual es compleix aquest fet equival al temps de latència ( $T$ ).

En conseqüència, el temps de latència indica el temps que es tarda, des de l'inici de l'experiència, a arribar a l'estat d'equilibri estacionari.

#### 1.3.4.3 Factors que influeixen en el pas de les substàncies actives a través de la Pell

Existeixen diferents factors que influeixen en el pas dels actius a través de la pell. Aquests factors els podem dividir en: factors biològics de la pell i factors fisicoquímics de la pell i el fàrmac.

##### Factors biològics:

- Estat de la pell: La pell actua de barrera protectora i qualsevol agressió, erupció, inflamació o lesió que alteri la seva integritat, farà augmentar la seva permeabilitat. Qualsevol patologia o lesió que alteri la integritat o continuïtat de la pell afectarà lògicament a l'efecte barrera i, en conseqüència, suposarà un augment de la permeabilitat. És el cas, per exemple, de patologies caracteritzades per un estrat corni defectuós com les dermatosis que presenten queratosi (psoriasis, èczemes, etc..). Això explica el fet de que les preparacions tòpiques són més eficaces durant les primeres fases d'aquestes patologies i van perdent la seva eficàcia a mesura que es recupera la pell, exercint així la seva funció barrera (*Brisson, 1974*).
- Edat de la pell: La permeabilitat de la pell varia en funció de la edat. Així, en nens la permeabilitat a través de la pell és superior a la dels adults (*Ritschel i cols., 1988*), degut a un major contingut lipídic de la mateixa i que l'estrat corni encara es troba en formació (*Williams i cols., 1988*). Així mateix la pell dels ancians és més permeable que la dels adults (*Bonina i cols., 1993*).
- Flux sanguini: Un increment del flux sanguini comporta un increment de la velocitat de les molècules que difonen degut a una diferència de gradient de concentració superior entre la superfície de la pell i els teixits dèrmics (*Ritschel, 1971*). En canvi si el flux sanguini de la zona és baix o disminueix, la substància no pot difondre a mesura que penetra, convertint-se en un factor limitant per l'absorció del fàrmac (*Barry i cols., 1983*).
- Zona corporal: La pell és un òrgan que s'adapta a les diferents regions corporals per satisfer les seves necessitats. El diferent gruix, la major o menor vascularització i el nombre d'estructures annexes fan que variï la velocitat de penetració del principi actiu en funció de la zona d'aplicació (*Ritschel i cols., 1988*).
- Metabolisme: L'epidermis presenta una activitat enzimàtica, i en la superfície de la pell trobem reaccions d'oxidació i reducció, reaccions hidrolítiques i reaccions

de conjugació. Al ser la pell un òrgan metabòlicament actiu, algunes substàncies es metabolitzen durant el seu pas a través de la pell (*Schaefer i cols., 1992; Baron i cols., 2001*).

- Hidratació de la pell: La hidratació de l'estrat corni augmenta el percentatge d'absorció percutània (*Ritschel i cols., 1988*). Una de les explicacions que es dona és que la hidratació incrementa les regions aquoses dels dominis de lípids intercel·lulars, el que augmenta el caràcter hidròfil del estrat corni. Això, a la vegada comporta a una reducció en el coeficient de distribució entre el SC i l'epidermis viva. Això finalment afavoreix la cinètica de transferència de fàrmacs des de l'estrat corni fins a l'epidermis viva. Aquest mecanisme no funcionaria en el cas de molècules que siguin molt liposolubles o quan estèricament els pas esta impedit per la grandària de la molècula (*Bronaugh i cols., 1999*). No obstant l'increment en la permeació de fàrmacs degut a una major hidratació de la pell no sols depèn del grau d'hidrofilia sinó també de la classe química a la que pertany la molècula (*Taylor i cols., 2002; Cross i cols., 2000*).
- Temperatura ambiental: Un increment de la temperatura de la pell suposa un augment del flux sanguini i, per tant, de la velocitat de permeació i absorció del principi actiu.

#### Factors fisicoquímics de la pell i el fàrmac:

- pH de la pell: La pell té un pH de 4.0-6.0. Aquestes condicions de pH afecten a la magnitud de dissociació de l'actiu i, per tant, a la capacitat de penetració a través de la membrana (*De-Meere i cols., 1983*). Per altre costat, en funció del pH de la formulació i el pKa del fàrmac, aquest està ionitzat en diferent grau. Les molècules no ionitzades presenten més facilitat de permeació (*Menzel i cols., 1978*).
- Coeficient de repartiment ( $K$ ): El coeficient de repartiment entre l'estrat corni i el vehicle aplicat a la pell és un factor de gran importància, donat que l'estrat corni es comporta com una membrana lipídica (*Ritschel i cols., 1988*). Generalment, amb el coeficient de repartiment pròxim a 1, s'obtindrà una permeació adequada de l'actiu a través de la pell. En canvi quan el coeficient està per sota de 1, les molècules són massa solubles en aigua per poder-se dissoldre en l'estrat corni, i amb coeficients de repartiment molt elevats, aquestes molècules quedaran retingudes a nivell de l'estrat corni o presentaran dificultats per travessar les capes inferiors de caràcter més hidròfil (*Leeson i cols., 1990*).



- Constant de permeabilitat del principi actiu: La constant de permeabilitat és una constant de velocitat (*Shaw i cols., 1991*) directament proporcional a la constant de difusió (D) i del coeficient de repartiment (K), d'acord amb l'equació 14. Al mateix temps la constant de difusió (D) ve afectada pel pes molecular de l'actiu. Aquesta constant disminueix si augmenta el pes molecular, segons la Llei de Stokes-Einstein (*Ritschel i cols., 1988*):

$$D = \frac{KT}{6\pi r\eta} \quad (\text{Eq. 22})$$

On:

K és la constant de *Boltzmann*

T és la temperatura absoluta

r és el radi de les partícules

$\eta$  és la viscositat del medi

- Concentració del principi actiu: La penetració de l'actiu es produeix per difusió passiva (*Leeson i cols., 1990*) i, per tant, depèn del gradient de concentracions que es produeix entre el vehicle i les capes de pell. Aquesta concentració es refereix a les molècules dissoltes en el medi, ja que són les úniques que poden difondre a través del estrat corni (*Shaw i cols., 1991*).
- Vehicle: El vehicle pot modificar l'absorció de l'actiu per dos motius principals. Per una part, la interacció del vehicle-actiu i per l'altra, degut a la capacitat d'alguns vehicles farmacèutics com poden ser emulsions, cremes, ungüents, gels, poden provocar canvis a l'estructura de la pell afectant a la seva permeabilitat (*Ritschel i cols., 1988*). Els mecanismes per els que poden provocar canvis són una acció dissolvent del estrat corni, un increment en la hidratació o un increment en la temperatura (*Maibach, 1984*).
- Propietats reològiques: La formulació ha de posseir una adequada extensibilitat i adaptabilitat a la superfície i cavitats cutànies. Per això, es recomana que siguin formulacions amb fluxos de tipus plàstic-tixotròpic, caracteritzats per un augment de la fluïdesa durant l'aplicació, seguida d'una recuperació de la textura inicial després de la extensió del producte, lo que permet mantenir-lo localitzat i adherit a la zona d'aplicació.

## CAPITOL II. OBJECTIUS I PLA DE TREBALL

---



## 2.1 OBJECTIUS I PLA DE TREBALL

En el camp de la Indústria Farmacèutica és molt rellevant la innovació galènica que permeti al fàrmac alliberar-se d'una forma ràpida, eficaç i segura. En els últims anys, l'enfoc i avanç de la investigació farmacèutica en el camps dels sistemes dispersos, ha permès el desenvolupament de formulacions amb propietats fisicoquímiques i farmacològiques desitjades, les quals modifiquen de manera acusada el procés d'alliberació del fàrmac.

Les emulsions múltiples d'aigua-en-oli-en-aigua (W/O/W) són sistemes dispersos de gran interès per la seva estructura i propietats, com a potencials sistemes d'administració de fàrmacs, que es formen per inversió de fases de una emulsió simple. Almenys, es requereixen dos agents tensioactius per a la formació, un amb valor baix de HLB (Balança equilibri hidròfil-lipòfil) per a l'emulsió primària W/O i l'altre amb valor alt d'HLB per a l'emulsificació secundària. Aquest sistema multiemulsionat proporciona en primer lloc, protecció dels fàrmacs inclosos en les diferents fases, capacitat per incorporar diversos actius en els diferents compartiments de l'emulsió i alliberament sostingut de fàrmacs (*Silva-Cunha i cols., 1997*).

El tractament tòpic de les micosis superficials i/o cutànies es prefereix sobre el tractament oral, per evitar els efectes adversos sistèmics, per l'alliberament del fàrmac al lloc de la infecció i l'alt compliment terapèutic. Els fàrmacs antifúngics es classifiquen, entre d'altres, segons les seves propietats químiques. Els derivats azòlics (inhibidors de l'enzim lanosterol 14- $\alpha$ -desmetilassa) constitueixen un dels grups més representatius i actualment són els fàrmacs d'elecció per a quasi totes les micosis superficials i/o epidèrmiques. Entre ells s'hi troben:

- Clotrimazol (CLT)
- Econazol (ECN)
- Bifonazol (BFZ)

La lipofília és una característica d'aquests antifúngics que afavoreix la penetració del fàrmac en l'estrat corni de la pell, la seva dispersió i la creació d'un efecte reservori a concentracions inhibidores en aquesta capa, els converteix en fàrmacs particularment indicats per al tractament tòpic de les micosis superficials i/o cutànies.

Una vegada revisada la bibliografia recent en el camp dels sistemes dispersos es proposen formulacions, tipus emulsions múltiples W/O/W, bàsiques e inèdites per a l'aplicació tòpica sobre la pell. En aquestes formulacions proposades s'hi vehiculen diferents agents antifúngics per tal d'avaluar les característiques fisicoquímiques i per últim veure el grau de

penetració sobre la pell i la permeació cutània dels preparats obtinguts. Donat que el primer inconvenient de les emulsions és la seva inestabilitat, el present treball pretén, en primer lloc interpretar la incidència dels components d'aquestes formulacions en les característiques fisicoquímiques, i en segon lloc justificar la viabilitat pràctica de les formulacions estudiades mitjançant l'estudi del nivell de permeació cutània ex-vivo i la seva eficàcia microbiològica. Per aconseguir aquests objectius la part experimental d'aquest treball inclou els següents apartats:

1. Revisar la bibliografia recent en el camp de les emulsions múltiples W/O/W d'aplicació tòpica, i actualització del coneixement sobre la terapèutica antifúngica actual per via tòpica.
2. Dissenyar unes emulsions múltiples inèdites utilitzant fàrmacs antifúngics azòlics.
3. Desenvolupar i validar una metodologia analítica per quantificar els principis actius en els estudis d'alliberació i permeació juntament amb la quantificació del principi actiu en els diferents sistemes dispersos obtinguts.
4. Caracterització fisicoquímica dels sistemes dispersos obtinguts i determinar la seva estabilitat.
5. Estudiar l'alliberació *in vitro* dels principis actius en les formulacions desenvolupades mitjançant cel·les de difusió vertical tipus *Franz* i membranes artificials, i determinar els corresponents models cinètics d'ajustament.
6. Realitzar els estudis de permeació cutània ex-vivo en pell de porc i humana dels principis actius en les formulacions desenvolupades mitjançant cel·les de difusió vertical tipus *Franz*.
7. Comprovar l'eficàcia antimicrobiana dels sistemes dispersos obtinguts i comparar-los amb els preparats de referència del mercat farmacèutic.

Finalment, la realització de tot aquest treball experimental ha donat lloc a la realització de la Tesi Doctoral, com a compendi de publicacions científiques de prestigi internacional, segons permet la normativa reguladora actual de Doctorat<sup>26</sup> de la UB, que es descriuen en el apartat de resultats.

---

<sup>26</sup> La normativa reguladora actual de Doctorat (Aprovada pel CdG en sessió de 16 de març de 2012 i modificada pel CdG de data 9 de maig i 19 de juliol de 2012, 29 de maig i 3 d'octubre de 2013, 17 de juliol de 2014, 16 de juliol de 2015, 15 de juny de 2016 i 21 de novembre de 2016) de la Universitat de Barcelona permet la realització de les Tesis Doctorals com a compendi de publicacions.

## 2.1 OBJECTIVES AND WORK PLAN

In the field of pharmaceutical industry it is very important the innovation in drug delivery that allows a quickly, effectively and safely drug release. In recent years, the focus and advance pharmaceutical research in the fields of dispersed systems, has allowed the development of formulations with desired pharmacological and physicochemical properties, which sharply change the process of release of the drug.

The water-in-oil-in-water (W/O/W) multiple emulsions dispersed systems are of great interest because of its structure and properties, as potential drug delivery systems, which are formed by phase inversion of a simple emulsion. At least two surfactants are required for their preparation, with a low value of hydrophilic-lipophilic balance (HLB) for the primary emulsion W/O and high HLB value for the secondary emulsification. This multiphase system provides first, protection of the drugs included in the different phases, the ability to incorporate different actives in different compartments of the emulsion and the sustained drug release (*Silva-Cunha i cols., 1997*).

The topical treatment of superficial and/or epidermal mycoses is preferred over oral therapy to avoid adverse systemic release of the drug to the site of infection, and high compliance. Antifungal drugs are classified, among others, according to their chemical properties. Azolic derivatives (lanosterol 14- $\alpha$ -demethylase enzyme inhibitor) constitute one of the most representative drugs for the treatment of superficial and/or epidermal fungal infections. Among them there are:

- Clotrimazole (CLT)
- Econazole (ECN)
- Bifonazole (BFZ)

The lipophilic nature is a feature of these antifungal drug that promotes penetration into the stratum corneum of the skin, their dispersion and the formation of a reservoir effect at inhibitory concentrations in this layer, making these drugs particularly suitable for the topical treatment of superficial and/or skin mycoses.

Once reviewed the recent literature in the field of dispersed systems, formulations type W/O/W emulsion are proposed, which are novel, basic and recommended for application on the skin. These formulations proposed convey different antifungal agents, their physicochemical characteristics are evaluated and finally the penetration of the skin and skin permeation preparations are obtained. As the first disadvantage of the emulsions is their instability, this paper aims firstly to interpret the impact of these components on the physical

and chemical formulations, and secondly to justify the practical feasibility of the formulations studied by the skin permeation study level *ex-vivo* and microbiological efficacy.

To achieve these objectives the experimental part of this work includes the following sections:

1. To review the recent literature in the field of multiple emulsion W/O/W topical and to update the knowledge of current antifungal therapy topically.
2. Design of a novel ME using azolic antifungal drugs.
3. To develop and validate a methodical analysis to quantify the active ingredients in the release and permeation studies with the quantification of the active ingredient in various dispersed systems obtained.
4. Physico-chemical characterization and the stability of the dispersed systems obtained.
5. To study the *in vitro* release of the active ingredients in the formulations developed by *Franz* type diffusion cell and artificial membranes and kinetic models to determine the appropriate adjustment.
6. To perform skin permeation studies *ex vivo* pig skin and human active ingredients in the formulations developed by *Franz* type diffusion cells.
7. To check the antimicrobial efficacy of the dispersed systems obtained and to compare them with the preparations currently leading the pharmaceutical market.

Finally, the realization of all this experimental work has led to the completion of the thesis as a compendium of scientific journals of international prestige, as required in the current regulations of the PhD UB programme, which are described in the results section.

## CAPITOL III. RESULTATS

---





### 3.1 RESULTATS

El treball experimental portat a terme en aquesta memòria ha donat lloc a tres publicacions científiques en forma d'articles publicats en diferents revistes de prestigi internacional. Els títols i autors es descriuen a continuació i al mateix temps cada article va acompanyat d'un breu resum:

#### **Article I:**

“DEVELOPMENT OF CLOTRIMAZOLE MULTIPLE W/O/W EMULSIONS AS VEHICLES FOR DRUG DELIVERY: EFFECTS OF ADDITIVES ON EMULSION STABILITY”.

J. Suñer-Carbó, A.C. Calpena-Campmany, B. Clares-Naveros, C. Cañadas-Enrich, L. Halbaut-Bellowa.

*AAPS Pharm Sci Tech.* 2017. 18(2), 539-550.

DOI: 10.1208/s12249-016-0529-8

Impact Factor: 1,954 (2015)

Pharmacy and Pharmacology 159/255 Q3 (2015).

#### **Article II:**

“SKIN PERMEATION OF ECONAZOLE NITRATE FORMULATED IN AN ENHANCED HYDROPHILIC MULTIPLE EMULSION”.

J. Suñer-Carbó, A. Boix-Montañés, L. Halbaut-Bellowa, N. Velázquez-Carralero, J. Zamarbide-Losada, N. Bozal-de-Febrer, A. C. Calpena-Campmany.

*Mycoses.* 2017. 60(3), 166-177.

DOI: 10.1111/myc.12575

Impact Factor: 2,332 (2015)

Dermatology 17/61 Q2 (2015); Mycology 12/29 Q2 (2015).

#### **Article III:**

“A NOVEL BIFONAZOLE MULTIPLE EMULSION FOR EPIDERMAL DELIVERY: INFLUENCE OF POLYSORBATE 80 UPON SKIN PENETRATION”.

J. Suñer-Carbó, A. C. Calpena-Campmany, L. Halbaut-Bellowa, B. Clares-Naveros, J. Zamarbide-Losada, E. Barbolini, A. Boix-Montañés.

Sotmès



“DEVELOPMENT OF CLOTRIMAZOLE MULTIPLE W/O/W EMULSIONS AS VEHICLES FOR DRUG DELIVERY: EFFECTS OF ADDITIVES ON EMULSION STABILITY”.

---

“Desenvolupament d'emulsions múltiples de clotrimazol com a vehicles per l'alliberament de fàrmacs: Efectes dels excipients en la estabilitat de l'emulsió”.

J. Suñer-Carbó, A.C. Calpena-Campmany, B. Clares-Naveros, C. Cañadas-Enrich, L. Halbaut-Bellowa.

*AAPS PharmSciTech.*

2017. 18(2), 539-550.

## **ARTICLE I**

## Article I:

### “DEVELOPMENT OF CLOTRIMAZOLE MULTIPLE W/O/W EMULSIONS AS VEHICLES FOR DRUG DELIVERY: EFFECTS OF ADDITIVES ON EMULSION STABILITY”.

#### Resum:

Les emulsions múltiples han pres interès en els últims anys com potencials sistemes d'alliberació de fàrmacs. L'objectiu del treball que es presenta és el disseny d'una nova formulació inèdita que conté clotrimazol en una emulsió múltiple. L'estudi ha desenvolupat 18 formulacions que contenen clotrimazol. Les formulacions han estat elaborades mitjançant el mètode conegut en dues etapes (“two-step emulsification method”), (*Matsumoto i cols., 1976*). Les emulsions preparades eren diferents quant a la concentració del co-emulgent primari i secundari, i la naturalesa de la fase oliosa (triglicèrids de cadena mitja, LP; oli de jojoba, YB; miristat de isopropil, IM). Els preparats han estat estudiats en base a les seves característiques fisicoquímiques com pH, conductivitat, reologia, mida de partícula, i l'anàlisi de la estabilitat mitjançant l'anàlisi òptica i tèrmica.

Les conclusions mostren que l'estabilitat de les emulsions W/O/W és altament dependent de la seva composició. La formulació més estable quant a característiques fisicoquímiques, reologia, menor mida de gota i estabilitat a 180 dies ha estat la formulació JMLP01 que conté LP 11%, CDC 1.5%, Span<sup>®</sup> 60 2%, i sense presència polisorbat 80 (Tween<sup>®</sup> 80) en la fase externa.

Aquesta formulació pot ser una alternativa a les fórmules comercials disponibles per al tractament de les infeccions micòtiques superficials i es proposa aquest sistema per a l'encapsulació d'altres agents antifúngics imidazòlics com econazol i bifonazol.



## Research Article

## Development of Clotrimazole Multiple W/O/W Emulsions as Vehicles for Drug Delivery: Effects of Additives on Emulsion Stability

Joaquim Suñer,<sup>1</sup> Ana C. Calpena,<sup>1</sup> Beatriz Clares,<sup>2,3</sup> Cristina Cañadas,<sup>1</sup> and Lyda Halbaut<sup>1</sup>

Received 17 January 2016; accepted 5 April 2016; published online 28 April 2016

**ABSTRACT.** Multiple emulsions have attracted considerable attention in recent years for application as potential delivery systems for different drugs. The aim of the present work is to design a new formulation containing clotrimazole (CLT) loaded into multiple emulsions by two-step emulsification method for transdermal delivery. Different ingredients and quantities like primary and secondary co-emulsifiers and the nature of oily phase were assayed in order to optimize the best system for good. Resulting formulations were characterized in terms of droplet size, conductivity, pH, entrapment efficiency, rheological behavior, and stability under various storage conditions for 180 days. pH values of multiple emulsions containing CLT ranged from  $7.04 \pm 0.03$  to  $6.23 \pm 0.04$ . Droplet size increased when increasing concentration of sorbitan stearate. The addition of polysorbate 80 resulted in significant decrease of oil droplet size comparing with those prepared without this. CLT entrapment efficiency ranged between 85.64% and 97.47%. All formulations exhibited non-Newtonian pseudoplastic flow with some apparent thixotropic behavior. Cross and Herschel-Bulkley equations were the models that best fitted experimental data. In general, the addition of 1% polysorbate 80 resulted in a decrease of viscosity values. No signals of optical instability were observed, and physicochemical properties remained almost constant when samples were stored at room temperature after 180 days. On the contrary, samples stored at 40°C exhibited pronounced increase in conductivity values 24 h after elaboration and some of them were unstable after 180 days of storage. JMLP01 was proposed as an innovative and stable system to incorporate CLT as active pharmaceutical ingredient.

**KEY WORDS:** clotrimazole; multiple emulsion; rheology; stability.

## INTRODUCTION

Clotrimazole (CLT), 1-[2-(2-chlorophenyl)diphenylmethyl]-1H-imidazole, is an imidazole drug with a broad-spectrum effect against many fungi. It has been used for the treatment of skin and vaginal infections caused by various species of pathogenic dermatophytes and yeasts (1). This effect is well known by the inhibition of ergosterol synthesis, via sterol-14-demethylase enzyme, promoting the fungal plasma membrane leakage. It has been reported as a promising agent for sickle cell anemia and cancer (2, 3). Furthermore, anti-inflammatory effects in

patients with rheumatoid arthritis (4), neuroprotective effect (5), and antimalarial effects (6) have been also reported. Nevertheless, some negative points have also been raised in its clinical applications, such as poor aqueous solubility (0.49 mg/L) (7) and low oral bioavailability with large differences (8). This oral administration has been related to severe hepatic toxicity (9). All these disadvantages make CLT a challenging therapeutic molecule for the research of new drug delivery systems. In this way, several strategies have been proposed for the oral administration such as complexation with cyclodextrins (8), microemulsions containing nanofibers (10), and ordered mesoporous silica by using supercritical carbon dioxide (11). For the topical administration, technological approaches such as solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers (12, 13), liposomes, niosomes (14), bioadhesive liposomal gels (15), or emulsion gels (16) have been investigated. Other topical approaches are oil-core polymeric nanocapsules (17) or bioadhesive patches (18).

Multiple water-in-oil-in-water (W/O/W) emulsions are of high interest due to their structure and properties as potential drug delivery systems which are formed by phase inversion of a simple emulsion. At least, two surfactants are required for

**Electronic supplementary material** The online version of this article (doi:10.1208/s12249-016-0529-8) contains supplementary material, which is available to authorized users.

<sup>1</sup> Department of Pharmacy and Pharmaceutical Technology, Faculty of Pharmacy, University of Barcelona, Barcelona, Spain.

<sup>2</sup> Department of Pharmacy and Pharmaceutical Technology, Faculty of Pharmacy, University of Granada, Granada, Spain.

<sup>3</sup> To whom correspondence should be addressed. (e-mail: beatrizclares@ugr.es)

the formation, one with low hydrophilic-lipophilic balance (HLB) value for the primary W/O emulsion and the other with high-HLB value for the secondary emulsification (19). This multi-emulsified system provides protection of the included drug, capacity to incorporate several activities in the different emulsion compartments, and sustained release (20).

As CLT treatments are intended for both oral and topical routes depending on the desired therapeutic effect, we developed an efficient, convenient, and flexible drug delivery system that could be useful for these two routes. It could be administered topically by direct application and orally by the inclusion in an adequate dosage form, such as gelatine capsules, because the large quantity of surfactants in formulations can induce gastrointestinal irritation (21).

The purpose of this research was first to screen for an appropriate primary W/O emulsion by evaluation of adequate amount of the primary surfactant and composition of the oily phase and secondly the addition or not of polysorbate 80 in the external aqueous phase. After the elaboration of multiple W/O/W emulsion for the CLT entrapment, different physical parameters (droplet size and morphology, conductivity, pH), stability, and rheological properties of the final formulation were investigated.

## MATERIAL AND METHODS

### Materials

Clotrimazole, sodium chloride, cetyl palmitate (CP), isopropyl myristate (IM), jojoba oil (YB), and polysorbate 80 (Tween<sup>®</sup> 80, HLB 15) were obtained from Acofarma (Barcelona, Spain), and sorbitan stearate (Span<sup>®</sup> 60, HLB 4.7) was obtained from Fagron (Terrassa, Spain). The lipophilic surfactant cetyl dimethicone copolyol (CDC, 14,000 MW, HLB 5; Abil<sup>®</sup> EM90), the amphoteric surfactant cocamidopropyl betaine (CMB, Tego<sup>®</sup> Betain F), and the emulsion stabilizer acrylic acid polymer (TGC, Tego<sup>®</sup> Carbomer 341ER) were supplied by Evonik-Goldschmidt GmbH (Essen, Germany). Capric/caprylic triglyceride (LP, Labrafac<sup>®</sup> Lyophile 1349) was supplied by Gattefosse (Saint-Priest, France). Purified water used in all experiments was self-produced from a Milli-Q<sup>®</sup> system (Millipore Iberica S.A.U., Madrid, Spain).

### Preparation of Multiple Emulsions

Multiple emulsions were prepared by the two-step emulsification process. Firstly, the primary W/O emulsion was prepared and then gently dispersed (50%, w/w) in the external water in order to obtain a multiple emulsion. A total of 18 multiple W/O/W emulsions were elaborated according to pre-formulation studies by varying the percentage of the primary surfactant sorbitan stearate (2–4%, w/w) and the percentage of polysorbate 80 (0–1%, w/w). "JMIP" series containing capric/caprylic triglyceride, "JMYB" series containing jojoba oil, and "JMIM" series containing isopropyl myristate as oily phases are shown in supplemental 1.

Primary W/O emulsions were prepared by the slow addition of the aqueous phase containing the electrolyte (NaCl) to the oily phase containing CLT (1%, w/w) at 80 ±

2°C under continuous stirring using a mechanical stirrer Schott RM 144 D (Schott Ibérica, Barcelona, Spain) at 500 rpm until cooling up to approximately 25°C. The oily phase was prepared previously by the addition of CLT, the selected lipophilic emulsifying agent (CDC or sorbitan stearate), and the corresponding oil (LP or YB or IM) preheated at 80 ± 2°C. These primary W/O emulsions were coded as JSLP, JSYB, and JSIM series, respectively.

In the second stage, 50% (w/w) of the obtained primary emulsion was slowly added to the outer water phase containing the secondary hydrophilic emulsifier (CMB and/or polysorbate 80) and TGC as a thickening agent while the system was stirred at 250 rpm at room temperature. After complete inclusion of the primary emulsion, the stirring was continued for 10 min until complete formation of multiple W/O/W emulsions. External aqueous gelled phase was prepared previously by dissolving the cross-linked TGC polymer in a co-solvent system comprising deionized water, the hydrophilic emulsifying agents (CMB and/or polysorbate 80), and TGC (previously dispersed and neutralized). Before this second emulsification, the thickening agent TGC was dispersed by a 24-h resting phase at room temperature. Once the thickener was wet out, it was also neutralized by adding the required quantity of NaOH solution (10%, w/v) to obtain pH value of 6.5–7.

### Microscopic Analysis

Multiple W/O/W emulsions were examined using an optical Leica DM 1000 LED light microscope (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany), and images were captured using a camera Leica EC3 (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) at ×400 magnifying power.

### Conductivity and pH Studies

Conductivity measurements ( $\mu\text{S}/\text{cm}$ ) of the multiple W/O/W emulsions were measured at room temperature with a dilution 1:20 in Milli-Q water under magnetic stirring with a conductivity meter Crison GLP 30 (Crison Instruments, Aella, Spain). Measurements were performed at room temperature directly in the diluted sample (mean ± SD,  $n=3$ ) 24 h and 180 days after elaboration.

The pH of multiple W/O/W emulsion samples was performed at room temperature using a digital pH meter Crison micropH 2000 (Crison Instruments SA, Aella, Spain). Measurements were performed in multiple emulsions by direct immersion of the electrode in the glass vial of the sample (mean ± SD,  $n=3$ ) at 24 h and 180 days after elaboration at room temperature.

### Droplet Size Measurement

Droplet size analysis of multiple W/O/W emulsions was performed by laser diffractometry (LD) using a Malvern Mastersizer 2000 (Malvern Instruments, Worcestershire, UK) and Milli-Q water as dispersant, yielding the relative distribution of volume of droplets in the range of size classes according to the Mie theory. Measurements were collected at room temperature (mean ± SD,  $n=3$ ). The droplet size in terms of volume distribution was reported as  $D[v,0.1]$ ,  $D[v,$

### Clotrimazole Multiple W/O/W Emulsion Stability Studies

541

0.5], and D[v,0.9], standard percentile readings for the analysis. The volume-weighted mean diameter, D[4, 3] ( $\mu\text{m}$ ), was also obtained from the device. D[4, 3] was measured 24 h and 180 days after elaboration at room temperature.

#### Drug Content

The percentage of incorporated CLT (drug content) was determined by spectrophotometric determination at 216 nm using a Helios Beta spectrophotometer (Thermo Scientific, Cambridge, UK). For sample preparation, triplicate aliquots of the blank and CLT loaded multiple W/O/W emulsions (0.5 g) accurately weighed were dispersed in methanol (5 mL) using Eppendorf centrifuge tubes and sonicated in an ultrasound bath for 10 min. After multiple W/O/W emulsions rupture by centrifugation at  $13,000 \times g$  for 30 min, the resulting supernatant was filtered (in Nylon disposable filter holders 0.45  $\mu\text{m}$ ) and properly diluted (1:10 with methanol and subsequently 1:5 with methanol/phosphate buffer (75:25)). Finally, absorbances obtained from drug solutions were processed in order to eliminate the error given by possible interferences of any excipient absorbing at the same wavelength ( $\lambda=216$  nm). Thus, absorbance blank samples were subtracted from those. Results are reported as mean  $\pm$  SD ( $n=3$ ).

#### Rheological Properties

Rheological measurements were performed using a Haake RheoStress 1 rheometer (Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe, Germany). Analyses of multiple W/O/W emulsions were carried out at  $25 \pm 0.2^\circ\text{C}$ , 24 h after preparation. For all of measurements, the device was connected to a thermostatic circulator Thermo Haake Phoenix II + Haake C25P and a computer provided with the Haake RheoWin<sup>®</sup> Job Manager v. 3.3 software (Thermo Electron Corporation, Karlsruhe, Germany) to execute the tests and Haake RheoWin<sup>®</sup> Data Manager v. 3.3 software (Thermo Electron Corporation, Karlsruhe, Germany) to perform the analyses of the obtained data, respectively. Two kinds of measurements were made for characterization, rotational measurements, and oscillatory tests.

#### Rotational Measurements

Steady-state measurements were addressed with cone and plate geometry (0.105 mm gap) with a fixed lower plate and a mobile upper cone Haake C60/2° Ti (60 mm diameter, 2° angle). The shear stress ( $\tau$ ) was measured as a function of the shear rate ( $\dot{\gamma}$ ). Viscosity curves ( $\eta=f(\dot{\gamma})$ ) and flow curves ( $\tau=f(\dot{\gamma})$ ) were recorded at  $25 \pm 0.1^\circ\text{C}$ . The shear rate ramp program included 3 min ramp-up period from 0 to  $100 \text{ s}^{-1}$ , 1 min constant shear rate period at  $100 \text{ s}^{-1}$ , and finally 3 min ramp-down period from 100 to  $0 \text{ s}^{-1}$ . Data from the flow curves (when resulted to be non-Newtonian) were fitted using mathematical models to identify the model that provided the best overall match of the experimentally observed rheological data: Bingham, Ostwald de Waele, Herschel-Bulkley, Casson, and Cross. The adequacy of the rheological profiles to the mathematical models was based on the correlation coefficient value ( $r$ ) and chi-square value.

The determination of the disturbance of the microstructure during the test or apparent thixotropy ( $\text{Pa/s}$ ) was evaluated by determination of the area of hysteresis loop. Steady-state viscosity ( $\eta$ ,  $\text{Pa s}$ ) was determined from the constant shear section at  $100 \text{ s}^{-1}$  and also from the ramp-up period at  $10 \text{ s}^{-1}$ . The rheological properties of the samples were observed 24 h after preparation and during storage conditions at room temperature.

#### Oscillatory Measurements

Dynamic tests were also performed using the same apparatus described above but with parallel plate and plate geometry (Haake PP60 Ti, 60 mm diameter, 0.5 mm gap separation between plates). Firstly, oscillatory stress sweep test was performed at a constant frequency of  $1 \text{ s}^{-1}$  to an increasing shear stress from 0.01 to 1000 Pa in order to determine the linear viscoelastic region (LVR) of the samples. After the determination of LVR, frequency sweep test was carried out varying the frequency range within  $0.01\text{--}10 \text{ s}^{-1}$  at a constant shear rate within the linear viscoelastic region (LVR), in order to determine the related variation of the storage modulus ( $G'$ ), loss modulus ( $G''$ ), phase angle ( $\delta$ ), and the complex viscosity ( $\eta^*$ ) which were used for sample characterization.

#### Stability Studies

##### Optical Characterization of the Stability

The stability of multiple W/O/W emulsions was assessed in triplicate by multiple light scattering using the Turbiscan<sup>®</sup> Lab (Formulation Co., L'Union, France). Undiluted samples ( $\sim 35$  mL) were placed into cylindrical glass measuring cells which were completely scanned by a reading head. A pattern of the light flux as a function of the sample height was obtained giving a macroscopic fingerprint of the sample at a predetermined time. Measurements were performed after 24 h after preparation at room temperature.

##### Long-Term Stability

Physicochemical properties of multiple W/O/W emulsions samples as droplet size (D[4.3]), pH, and conductivity as well as viscosity and drug content of samples were analyzed over a period of 180 days at room temperature and compared to the starting point. Conductivity and pH measurements were also addressed after storage at  $40^\circ\text{C}$ .

##### Thermal Stability

Thermal stability tests were also performed at different storage conditions for both primary emulsions and multiple W/O/W emulsions. Test tubes were kept vertically and stored at  $4 \pm 0.1^\circ\text{C}$  (in refrigerator),  $30 \pm 0.1^\circ\text{C}$ ,  $40 \pm 0.1^\circ\text{C}$  in stability cabins (Heraeus B 5042 E and I 42, Madrid, Spain), and room temperature. Macroscopic analyses were performed by the direct phase behavior observation in the resultant multiple W/O/W emulsions evaluating potential appearance of creaming, phase separation, or color changes. Observations were made each week for 180 days.



### Release Studies

Release studies were performed using vertical Franz diffusion cell (FDC 400, Crown Glass, Somerville, USA) and dialysis cellulose membranes (MWCO 12–14 KDa) with an effective diffusional area of 2.54 cm<sup>2</sup> at room temperature. A solution of methanol/water/transcutol-P (40:50:10, v/v) was used as receptor medium allowing sink conditions. Amounts of JMLP01 and a commercial cream as reference, equivalent to 4 µg of CLT, were added to the donor compartment. Samples (300 µl) were withdrawn from the receptor chamber at selected time intervals for 75 h and replaced with the same volume of receptor medium.

The concentration of released CLT was measured by spectrophotometry as described previously.

### Statistical Analysis

Results are expressed as mean ± SD of at least three replicates. One-way analysis of variance (ANOVA) was carried out testing the differences between the mean values using Prism1, V. 3 software (GraphPad<sup>®</sup> Software, Inc., San Diego, CA). Results were considered to be significant if  $p < 0.05$ .

## RESULTS

### Elaboration of Multiple W/O/W Emulsions

The freshly prepared multiple W/O/W emulsions appeared as white (except JMYB series that appeared yellowish), odorless, and homogenous without any signs of phase separation. JMIM03 and JMIM03T multiple emulsions were not formed during the elaboration process. In the case of simple W/O emulsions, they appeared as white (except JMYB series that appeared yellowish), odorless, and homogenous with high consistency. Phase separation of all simple W/O emulsions was evident 24 h after preparation.

### Microscopic Studies

The optical microscopy method confirmed the structures of multiple W/O/W emulsions. Small droplets were present in the internal phase of the multiple globules. Figure 1 shows photomicrographs of multiple W/O/W emulsions 24 h after preparation. Observed droplet diameters of multiple W/O/W emulsions were 20–60 µm approximately. These results were later in accordance with those of LD measurement in most cases. It can be also observed that internal droplets of the primary W/O emulsions were 1–10 µm approximately.

### pH and Conductimetric Analyses

pH values of multiple W/O/W emulsions containing CLT at  $t_0$  ranged from 7.04 ± 0.03 to 6.23 ± 0.04 in samples kept at room temperature. For samples kept at 40°C, the pH ranged from 7.10 ± 0.03 to 6.20 ± 0.01 (supplemental 2). Moreover, pH values of multiple W/O/W emulsions were similar to the pH of the outer aqueous phase (pH outer aqueous phase = 6.89 ± 0.02 and 6.92 ± 0.01 at room temperature and 40°C, respectively). Values of electrical conductivity of samples

ranged from 352.6 ± 4.0 to 198.3 ± 6.5 µS/cm in samples kept at room temperature after 24 h (supplemental 2).

### Droplet Size

The average values of D[3, 4] for the trial formulations, accompanied by their respective standard deviation, are shown in supplemental 2. Figure 2 shows droplet size distribution of multiple W/O/W emulsions. Values are the mean diameter ( $n=3$ ) of volume distribution D(v,0.1), D(v,0.5), and D(v,0.9), 24 h and 180 days storage at room temperature. It can be observed more heterogeneous distribution in JMLP series, followed by JMYB and finally JMIM.

### Drug Content

CLT content was determined and expressed as percent by the difference between total and free concentrations of drug in multiple W/O/W emulsion samples. Drug content values ranged between 85.64% for JMIM01T and 97.47% for JMLP01 which exhibited the highest drug content value. After performing a Student *t* test, no statistically significant differences ( $p > 0.05$ ) were observed between multiple W/O/W emulsions.

### Rheological Studies

Flow and viscosity curves are depicted in Fig. 3. The flow curves indicated some apparent thixotropic behavior in the system. The rheograms displayed a hysteresis loop with the downward curve below the upward curve. The apparent thixotropy values ranged between 24.88 mPa/s for JMIM01T and 990.3 mPa/s for JMYB03.

The mathematical models that provided the best overall match of the experimentally observed rheological data based on the highest correlation coefficient of the linear regressions ( $r$ ) and the lowest chi-square value were Cross and, in some cases, Herschel-Bulkley models in ascending stretches (from 0 to 100 s<sup>-1</sup>) and Cross model in all cases in descending stretches (from 100 to 0 s<sup>-1</sup>). Figure 4a shows the viscosity versus shear stress curves for the primary W/O emulsions (JSLP01, JSYB01, and JSIM01 samples). Figure 4b shows the viscosity versus shear stress curves of the final internal aqueous phase with and without polysorbate 80. Finally, Fig. 5 shows the sweep stress curve with storage and loss modulus data as a function of shear stress (Pa) of the multiple W/O/W emulsion samples.

### Stability Studies

Stability of multiple W/O/W emulsions was assayed by optical measurement of backscattering (BS) readings, due to the opacity of samples which gives kinetic information on the process leading to phase separation. If the destabilization phenomenon occurs, a backscattering increase versus time can be observed. Variations ≥ 10% indicate unstable formulations (22). No signals on the variation of the droplet volume fraction (migration) or mean size (coalescence) were observed (% ΔBS < 10%).

In order to investigate long-time stability of multiple W/O/W emulsions, droplet size (D[4.3]), pH, and conductivity

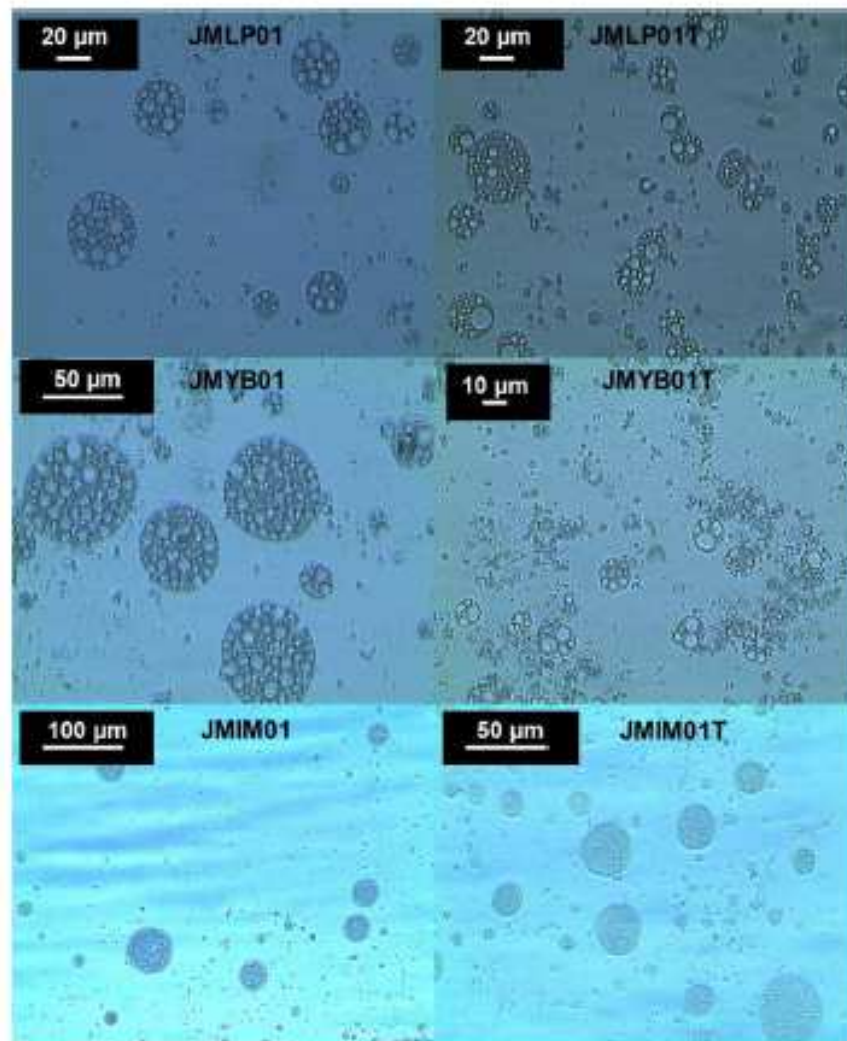


Fig. 1. Photomicrograph examples of multiple W/O/W emulsions 24 h after preparation.  $\times 400$  magnification

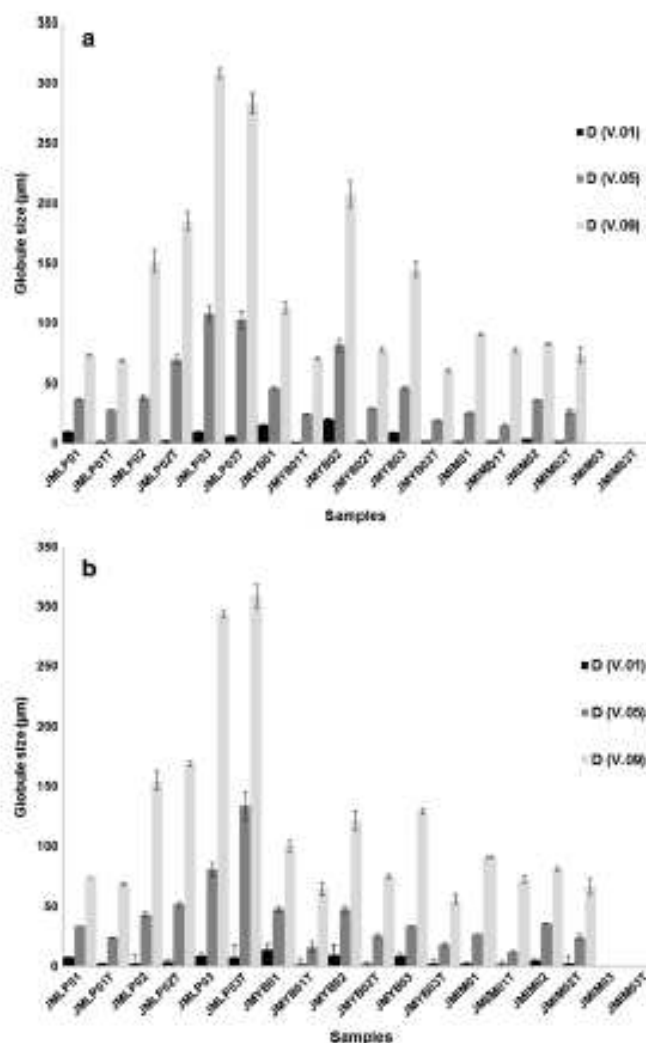
as well as viscosity of all samples were analyzed over a period of 180 days at room temperature. Conductivity and pH measurements were also addressed after storage at  $40^{\circ}\text{C}$ . Photomicrographs at various time intervals are shown in supplemental 3. No significant changes in droplet size distribution were observed after storage time except in the case of JMYB02, which modified the droplet size between  $99.79 \pm 5.6 \mu\text{m}$  at  $t_0$  and  $61.99 \pm 4.9$  after 180 days of storage at room temperature.

Regarding pH, values remained constant over time allowing maximum stability and suitability for topical application; pH values after 180 days of storage at room temperature were in the range of  $6.13 \pm 0.01$ – $6.77 \pm 0.03$  and  $5.5 \pm 0.05$ – $6.92 \pm 0.03$  at  $40^{\circ}\text{C}$ . In this line, conductivity values varied from  $325 \pm 5.7$  to  $219.3 \pm 7.1 \mu\text{S/cm}$  for samples stored at room temperature after 180 days. These results showed slight increase in conductivity during this storage conditions, remaining almost identical in the following formulations: JMLP02, JMLP03, JMYB01T, JMIM01T, and JMIM02T.

Contrarily, samples stored at  $40^{\circ}\text{C}$  exhibited pronounced increase in conductivity values 24 h after elaboration and some of them were unstable after 180 days of storage (supplemental 2). The storage effect on the rheology of multiple W/O/W emulsions is shown in the supplemental 4.

The drug content in samples was repeated in triplicate after 180 days of storage at room temperature, and no statistically significant differences were observed when compared with results at  $t_0$ .

Finally, stability under thermal conditions revealed that after 6 months, multiple W/O/W emulsions exhibited no precipitation of drug, phase separation, creaming, and any change of appearance and visual observation in any of the samples kept at room temperature (Table I) except JMIM03 and JMIM03T which were not formed during elaboration process. At  $40^{\circ}\text{C}$ , JMLP01T became unstable after 117 days, as well as JMLP02 (56 days), JMYB01 (21 days), JMYB02 (21 days), JMIM01 (15 days) JMIM01T (15 days), and JMIM02T (98 days).



**Fig. 2.** Droplet size distribution of multiple W/O/W emulsions. Values are the mean diameter ( $n=3$ ) of volume distribution  $D(v,0.1)$ ,  $D(v,0.5)$ , and  $D(v,0.9)$ , 24 h after elaboration (a) and 180 days of storage at room temperature (b)

### Release Studies

Figure 6 shows the release of CLT from JMLP01 and a reference cream. A slightly higher release from JMLP01 when compared with the cream was observed. The total CLT release was reached in 25 h approximately.

### DISCUSSION

As primary factors affecting the formation of multiple W/O/W emulsions are the chemical nature of components, the concentration of the surfactants used in both steps of emulsification, the volume fraction of the primary emulsion in the whole multiple emulsions, and the mixing conditions (23).

The selection of the oil phase was conducted by preliminary studies according to the formation of primary emulsions W/O and the solubilization of CLT. Different oils

(paraffin oil, castor oil, sweet almond oil, and wheat germ oil) were tested and then discarded due to their low capacity for the dissolution of CLT and unstable system obtained. The nature of oils selected (LP, YB, and IM) are also well tolerated on the skin. In this line, other preliminary studies revealed optimal results for concentrations of polymeric surfactant about 1–1.5% (w/w) and oily phase between 12 and 18% (w/w).

The use of the required temperature in the primary emulsion should be controlled; in our case, 80°C was required in order to get the melting point of oil phase. Several studies reported the need of stabilization the primary W/O emulsion against flocculation and coalescence (19). Increasing the osmotic pressure by electrolytes inside droplets counteracts the Laplace responsible for Ostwald ripening processes by increasing the hydrophobicity in the dispersed phase (24). For this reason, electrolyte NaCl was incorporated at 0.25% (w/w). This concentration is sufficiently high so as to compensate

## Clotrimazole Multiple W/O/W Emulsion Stability Studies

545

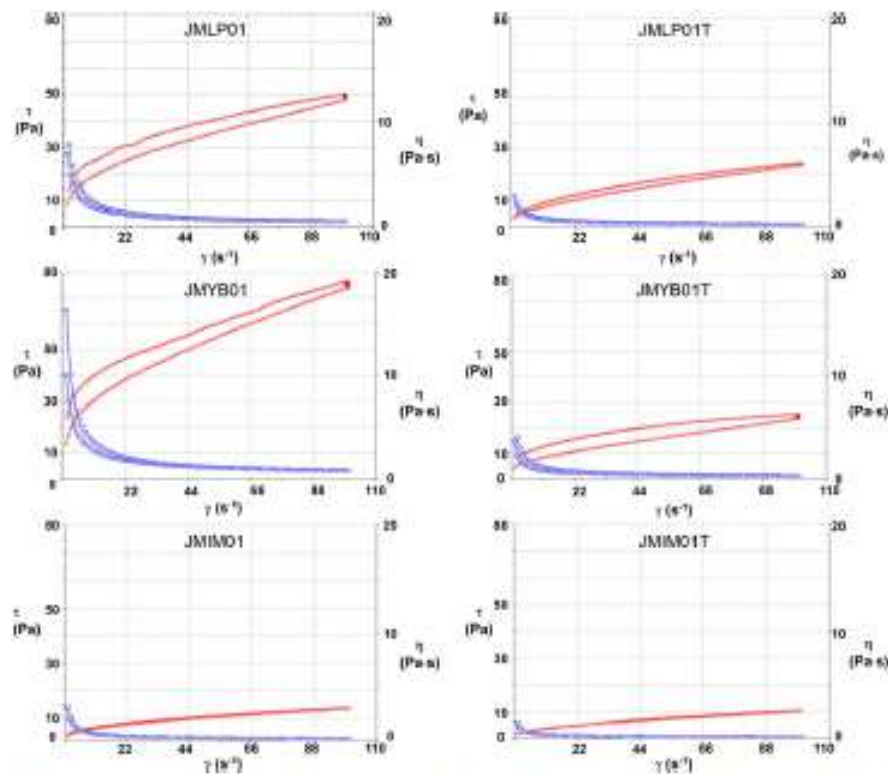


Fig. 3. Viscosity curves (blue line) and flow curves (red line) of JMLP01, JMLP01T, JMYB01, JMYB01T, JMIM01, and JMIM01T multiple W/O/W emulsion samples 24 h after preparation at room temperature

for Laplace pressure but, at the same time, low enough so as to inhibit osmotic swelling of the water inner droplets (25).

On the other hand, polymeric emulsifiers are highly suitable for increasing the long-term stability of emulsions in combination with low-weight emulsifiers. The polymeric emulsifier used in this work was CDC. It is an ideal low-HLB polymeric emulsifier for producing the initial W/O emulsion that can be emulsified in an external aqueous gellified phase containing the hydrophilic emulsifier with very good stabilizing properties (26). Besides, two different surfactants were added, sorbitan stearate with HLB 4.7 and polysorbate 80 with HLB 15. The low-HLB surfactant is dominantly hydrophobic and is added to the oil phase. The high-HLB surfactant is dominantly hydrophilic and is added to the outer continuous aqueous phase. The concentration ratio of these two surfactants is also important to the stability and yield of multiple W/O/W emulsions (23). For this reason, the incidence on stability of different amounts of these components was also evaluated, as well as the oily phase that provides greater stability.

According to optical microscopy images, multiple W/O/W emulsion samples could be considered as type C, as reported by Florence and Whitehill (23). They described type C emulsions as emulsions composed of large drops that entrapped large number of droplets inside themselves. This analysis also confirmed the minor yield of multiple W/O/W emulsions prepared with IM when

compared with LP and YB. In fact, JMIM03 and JMIM0BT failed to form completely after elaboration.

pH values showed good compatibility for dermal administration. Conductimetric analysis was carried out in order to measure the entrapped electrolyte in the inner aqueous phase of the primary emulsion and detect any leakage from this phase to the outer aqueous phase. When no migration of electrolytes encapsulated in the inner water occur, the multiple emulsion system could be catalogued as stable. An increase in conductivity involves a migration of electrolytes (27). It can occur as a result of diffusion or droplet breaking. Strong osmotic impact of NaCl may cause destruction of oil film and thus phase inversion (28).

It was noted that multiple W/O/W emulsion droplet size increased in formulation series prepared at increasing concentration of sorbitan stearate from 2% to 4% in the internal phase (e.g., JMLP01  $40.39 \pm 0.3 \mu\text{m}$ ; JMLP03  $134.14 \pm 3.1 \mu\text{m}$  at 24 h of preparation). It may be attributed to the higher accumulation of surfactant at the interface, resulting in a thicker interfacial film and hence increase of droplet size (29). This increase was then also observed in viscosity values. Moreover, it has to be pointed out that the addition of stabilizer polysorbate 80 in the gelling acrylic acid polymer resulted in significant decrease of oil droplet size comparing with those prepared without this (e.g., JMLP01  $40.4 \pm 0.3 \mu\text{m}$ ; JMLP01T  $31.2 \pm 0.2 \mu\text{m}$  at 24 h of preparation). Identical characteristics

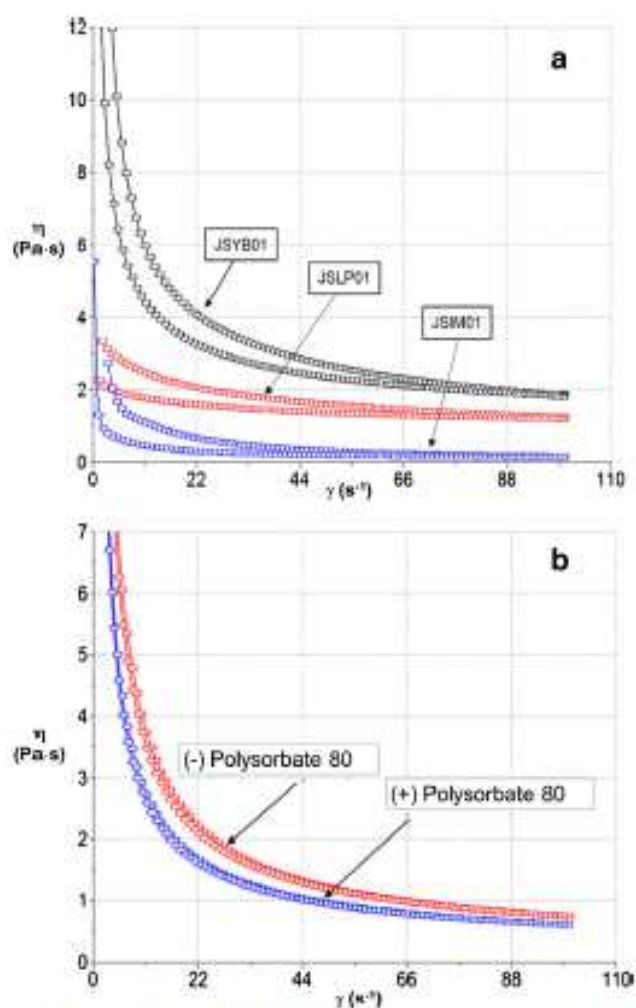


Fig. 4. Viscosity curves of primary emulsion JSLP01, JSYB01, and JSIM01 series after preparation (a) and external aqueous phase without polysorbate 80 (-) and with polysorbate 80 (+) (b)

were observed in all samples during the 180 days of storage (e.g., JMLP01  $40.4 \pm 0.3 \mu\text{m}$  at 24 h; JMLP01  $38.2 \pm 0.1$  at 180 days). The incorporation of CLT in multiple W/O/W emulsion systems results in an increase in size distribution and was appreciated when compared with unloaded multiple W/O/W emulsions (e.g., JMLP01 loaded  $40.4 \pm 0.3 \mu\text{m}$ ; JMLP01 unloaded  $30.2 \pm 0.2 \mu\text{m}$ ). An increase in droplet size after drug incorporation is a general phenomenon observed with several drugs (30). Heterogeneity in droplet size distribution was in the following order JMLP > JMYB > JMIM. It might be due to the required HLB to be emulsified, LP < YB < IM (1, 6.5, and 11.5, respectively) in the primary W/O emulsions.

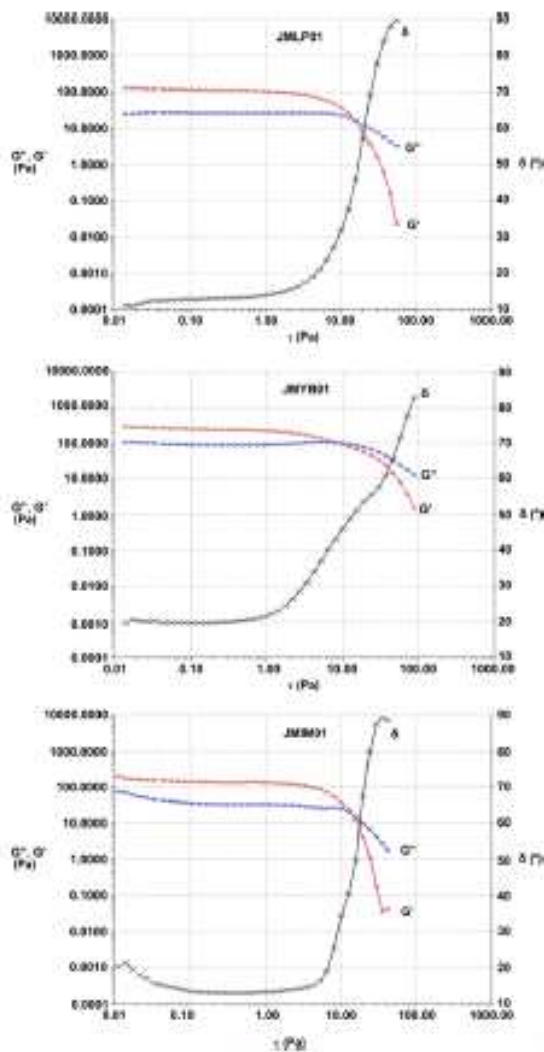
Understanding of multiple W/O/W emulsions rheology is an important factor for both elaboration and handling operations and physical stability (31). It could provide also useful information on the multiple W/O/W emulsion structure and drug delivery (32). The results of the steady-state rheological measurements first showed that

assayed multiple W/O/W emulsions were dependent on shear rate (Fig. 3). All formulations exhibited non-Newtonian pseudoplastic flow and shear thinning behavior showing a consistent decrease in viscosity with increasing shear rate from 0 to  $100 \text{ s}^{-1}$ . The thixotropic behavior demonstrated a disturbance of the multiple W/O/W emulsion microstructure under the effect of shear rate. In this case, the shear induces irreversible structural changes which could be interpreted as a breakup of multiple droplets without inversion producing a decrease of volume fraction and consequently a decrease in the viscosity or a phase inversion to W/O producing a substitution of a more viscous phase for the external phase and consequently an enhancement of the viscosity values (33). Nonetheless, concerning topical administration, the thixotropy is a desired property because it contributes to increase the retention time of the formulation in the local of application (34).

Mathematical models that best fit experimental data were the Cross equation that provides a general model for

## Clotrimazole Multiple W/O/W Emulsion Stability Studies

547



**Fig. 5.** Storage modulus ( $G'$ ), loss modulus ( $G''$ ), and phase angle ( $\delta$ ) of the developed multiple W/O/W emulsions during sweep stress test on JMLP01, JMYB01, and JMIM01 samples 24 h after preparation at  $1 \text{ s}^{-1}$  frequency

pseudoplastic materials and Herschel-Bulkley which is a three-parameter model used to describe viscoplastic materials.

Concerning viscosity measurements, the nature of the oil was important in the final properties of multiple W/O/W emulsion systems (23). It is believed that the viscosity of the oil phase has a dominant effect on the physicochemical characteristics of multiple W/O/W emulsions. In this line, JMYB series were the samples with highest values and JMIM series the less viscous samples at  $10 \text{ s}^{-1}$ .

The primary emulsions are non-Newtonian, and the viscosity decreases with an increase in shear stress supporting the results obtained in the final multiple W/O/W emulsion samples. It was noted that in freshly prepared JMYB series at increasing sorbitan stearate rate (2, 3, and 4%; JMYB01, JMYB02, and JMYB03, respectively), viscosity values increased too (supplemental 2). Similar tendency was exhibited in JMIM series but not in JMLP series. On the other hand, as Fig. 4b shows, the

addition of polysorbate 80 became the internal aqueous phase less viscous. This fact was then observed in the final multiple W/O/W emulsions. The addition of 1% polysorbate 80 resulted in a decrease of viscosity in all samples except JMLP02. This tendency might be related by the smaller droplet size (35).

The flow and viscosity curves of W/O/W emulsions (Fig. 3) showed not only their pseudoplastic behavior accompanied by a slightly apparent thixotropy but also their acceptable stability under the shearing stress which did not caused drastic irreversible changes in their structure (the upward and downward curves are not too separate) which is an advantage for skin application due to the shear thinning effect. Moreover, the higher viscosity values for JMYB01 and JMLP01 emulsions compared to the other ones under study are a benefit to the physical stability of the system during storage (36).

As regards the dynamic rheology, this measurement provides more direct correlation with microstructure than steady rheology since materials can be examined at rest state without causing any disruption of their underlying structures.

The end point of the LVR was determined as a critical stress when the  $G'$  value was dropped 10% from the linear level. The critical stress was found at stresses below approximately 2 Pa for all formulations studied at  $1 \text{ s}^{-1}$ . According to the results, a constant shear stress of 1 Pa (50% of the critical value) was selected to perform the frequency sweep test (Fig. 7). These tests revealed the preponderance of the elastic behavior over the viscous ( $G' > G''$ ). It is known as elastic plateau.  $G'$  is an indicator of elastic behavior and reveals the ability of system to storage elastic energy associated with recoverable elastic deformation.  $G''$  is a measure of the dynamic viscous behavior that relates to the dissipation of energy associated with unrecoverable viscous loss. It was also observed that the value of  $G'$  increased in most cases when the sorbitan stearate rate increased (2, 3, and 4%), which was accompanied by an increase in the mean droplet diameter too. In this sense (37), increased elasticity with the augmentation of surfactant was also reported.

However, the incorporation of polysorbate 80 dramatically decreased the elastic behavior and globule size. Regarding the obtained  $\eta^*$  values, oscillatory viscosity tests supported the results of rotational tests. The highest viscosity was observed in JMYB formulation series at  $0.10 \text{ s}^{-1}$ .

The oscillatory tests also show that multiple emulsions display viscoelastic properties with predominant elastic component (Figs. 5 and 7). The exhibition of large plateau zone evidences the existence of a structure that promotes the physical stability of the system due to its elastic characteristic. In this regard, JMYB01 should be highlighted as double emulsion presents higher values not only for  $G'$  but also for  $G''$  and  $\eta^*$  (Fig. 7).

Physical destabilization was measured using an optical analyzer allowing for real-time kinetic information on the process leading to phase separation. It could be also possible to discriminate between droplet migration (creaming, sedimentation) and droplet size variation

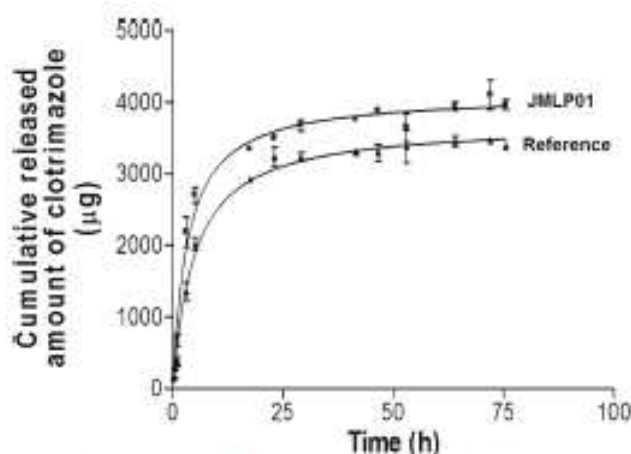
**Table 1.** The Influence of Temperature on Stability of Multiple W/O/W Emulsions

Formulation coded	Room temperature	Days	30°C	Days	40°C	Days
JMLP01	Stable	>270	Stable	>270	Stable	>270
JMLP01T	Stable	>270	Stable	>270	Phase separation	117
JMLP02	Stable	>270	Stable	>270	Phase separation	56
JMLP02T	Stable	>270	Stable	>270	Phase separation	177
JMLP03	Stable	>270	Stable	>270	Stable	>270
JMLP03T	Stable	>270	Stable	>270	Stable	>270
JMYB01	Stable	>270	Phase separation	28	Phase separation	21
JMYB01T	Stable	>270	Stable	>270	Stable	>270
JMYB02	Stable	>270	Phase separation	56	Phase separation	21
JMYB02T	Stable	>270	Stable	>270	Stable	>270
JMYB03	Stable	>270	Stable	>270	Stable	>270
JMYB03T	Stable	>270	Stable	>270	Stable	>270
JMIM01	Stable	>270	Stable	>270	Phase separation	15
JMIM01T	Stable	>270	Stable	>270	Phase separation	15
JMIM02	Stable	>270	Stable	>270	Stable	>270
JMIM02T	Stable	>270	Stable	>270	Phase separation	98
JMIM03	Phase separation	0	Phase separation	0	Phase separation	0
JMIM03T	Phase separation	0	Phase separation	0	Phase separation	0

(coalescence, flocculation). Figure 8 shows the BS profiles of JMLP03, JMYB02, and JMIM01T. The left side of the curve corresponds to the bottom of the vial, whereas the right side corresponds to the sample behavior on the top of the vial. It can be observed that there are constant signals (superimposition) without variations. Peaks at the top and the bottom of the vial correspond to the meniscus made by the sample in contact with glass. Furthermore, instability was defined either by a loss of viscosity, a phase separation, or a phase inversion. In general, observed samples by optical microscopy remained invariant over the whole storage period (room temperature) indicating the absence of external and internal phase separation or inversion.

As can be observed from supplemental 4, among JMYB series, viscosity values slightly increased over time except JMYB01 and JMYB02 due to initial destabilization confirmed by thermal stability studies at 40°C. Slight increase was also observed among JMLP series except

JMLP01 which exhibited small decrease. Finally, JMIM series behaved similarly among them with slight and uniform increase in viscosity values over time. Viscosity changes in multiple W/O/W emulsions over time could depend on the diffusion from the inner aqueous phase to the outer continuous phase or vice versa. In this manner, diffusion of water from the continuous aqueous phase into the inner aqueous phase entails an increase in viscosity. The opposite process results in a viscosity decrease. This passage of water in one way or the other is driven by osmotic pressure differences (38). Anyway, all observed these changes were small, revealing optimal stability of multiple W/O/W emulsions. Finally as expected, temperature had an important influence in stability of these systems. It seems that JMLP series were the best stables against temperature conditions because all formulations were stable after 180 days at 30°C, although at 40°C results were similar with JMYB series.



**Fig. 6.** Release profile of CLT from JMLP01 and from a cream (reference)

## Clotrimazole Multiple W/O/W Emulsion Stability Studies

549

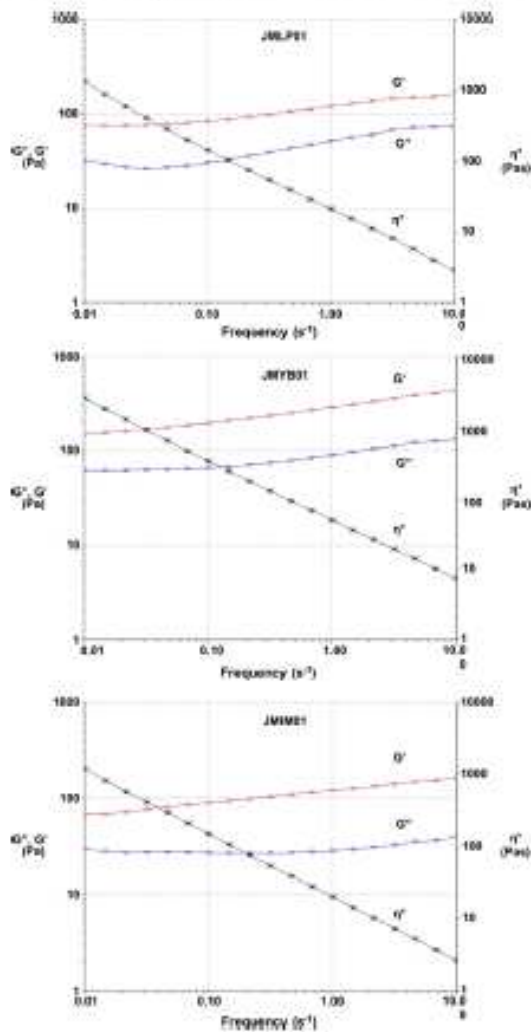


Fig. 7. Storage modulus ( $G'$ ), loss modulus ( $G''$ ), and complex viscosity ( $\eta^*$ ) versus frequency ( $s^{-1}$ ) during frequency sweep test on JMLP01, JMYB01, and JMIM01 24 h after preparation

## CONCLUSIONS

In conclusion, this study demonstrated that stability of multiple W/O/W emulsions is highly dependent on composition. As a rule, the most stable formulations were achieved using LP and can be stabilized by a combination of polymeric and low lipophilic co-emulsifiers. JMLP01 with CDC 1.5%, sorbitan stearate 2%, and LP 11% appeared to be the highest long-term stable ME with the lowest droplet size, good physicochemical characteristics, flow behavior, and high encapsulation efficiency at different storage conditions for the 180-day storage. These proposed multiple W/O/W emulsions are stable systems with rheological behavior which might be an excellent alternative to the commercially available formulas for the treatment of skin fungal infections. The formulations proposed might be also utilized as useful systems for other imidazole antifungal drugs. In fact, other drugs like econazole and bifonazole are being studied as potential candidates.

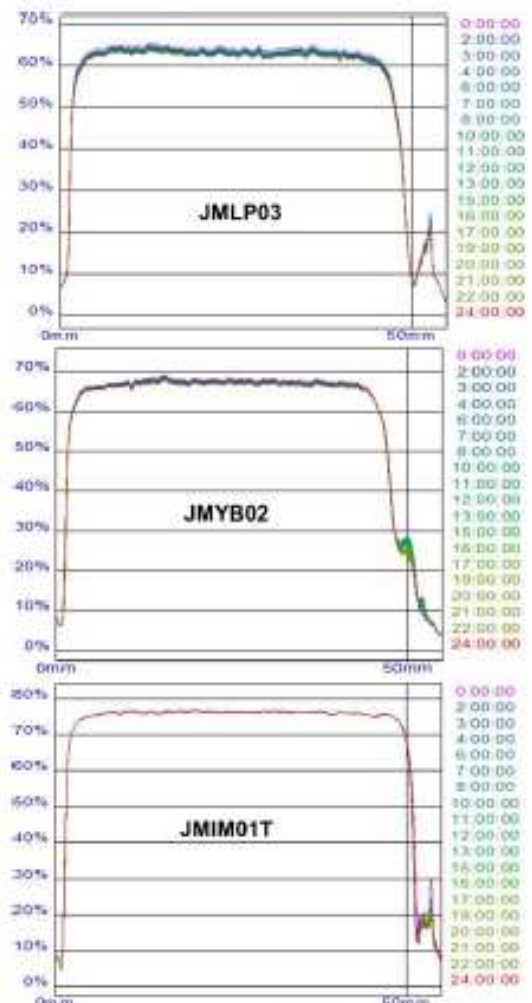


Fig. 8. Superimposed backscattering fingerprints of JMLP03, JMYB02, and JMIM01T multiple O/W/O emulsions

## ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Evonik and Gattefossé for their generous gifts of excipients and formulation advices. In memoriam Prof. Coloma Barbé.

## REFERENCES

1. Henry KW, Nickels JT, Edlund TD. Upregulation of ERG genes in *Candida* species by azoles and other sterol biosynthesis inhibitors. *Antimicrob Agents Chemother.* 2000;44:2693-700.
2. Benzaquen LR, Brugnara C, Byers HR, Gatton-Celli S, Halperin JA. Clotrimazole inhibits cell proliferation in vitro and in vivo. *Nat Med.* 1995;1(6):534-40.
3. Brugnara C, Gee B, Armsby CC, Kurth S, Sakamoto M, Rifa'i N, et al. Therapy with oral clotrimazole induces inhibition of the Gardos channel and reduction of erythrocyte dehydration in patients with sickle cell disease. *J Clin Invest.* 1996;97(5):1227-34.



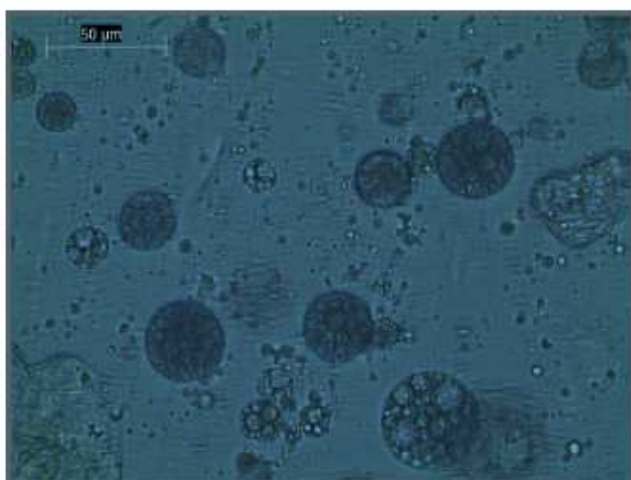
4. Ning M, Guo Y, Pan H, Chen X, Gu Z. Preparation, in vitro and in vivo evaluation of liposomal/niosomal gel delivery systems for clotrimazole. *Drug Dev Ind Pharm.* 2005;31(4-5):375-83.
5. Isaev NK, Stelmashook EV, Dirnagl U, Andreeva NA, Manuhova L, Vorobjev VS, et al. Neuroprotective effects of the antifungal drug clotrimazole. *Neuroscience.* 2002;113(1):47-53.
6. Gemma S, Campiani G, Butini S, Kukreja G, Coccone SS, Joshi BP, et al. Clotrimazole scaffold as an innovative pharmacophore towards potent antimalarial agents: design, synthesis, and biological and structure-activity relationship studies. *J Med Chem.* 2008;51(5):1278-94.
7. Pedersen M, Bjerregaard S, Jacobsen J, Sørensen AM. A genuine clotrimazole (cyclodextrin inclusion complex-isolation, antimycotic activity, toxicity and an unusual dissolution rate. *Int J Pharm.* 1998;176:121-31.
8. Prabagar B, Yoo BK, Woo JS, Kim JA, Rhee JD, Piao MG, et al. Enhanced bioavailability of poorly water-soluble clotrimazole by inclusion with beta-cyclodextrin. *Arch Pharm Res.* 2007;30:249-54.
9. Yong CS, Li DX, Prabagar B, Park BC, Yi SJ, Yoo BK, et al. The effect of cyclodextrin complexation on the bioavailability and hepatotoxicity of clotrimazole. *Pharmazie.* 2007;62:756-9.
10. Tonglairoum P, Ngawhirunpat T, Rojanarata T, Kaomongkolgit R, Opanasopit P. Fabrication of a novel scaffold of clotrimazole-microemulsion-containing nanofibers using an electrospinning process for oral candidiasis applications. *Colloids Surf B: Biointerfaces.* 2015;126:18-25.
11. Gignone A, Manna L, Ronchetti S, Banchero M, Orida B. Incorporation of clotrimazole in ordered mesoporous silica by supercritical CO<sub>2</sub>. *Micropor Mesopor Mat.* 2014;200:291-96.
12. Souto EB, Müller RH. Rheological and in vitro release behaviour of clotrimazole-containing aqueous SLN dispersions and commercial creams. *Pharmazie.* 2007;62:505-9.
13. Ravani L, Esposito E, Bories C, Lievin-Le Moal V, Loiseau PM, Djahourov M, et al. Clotrimazole-loaded nanostructured lipid carrier hydrogels: thermal analysis and in vitro studies. *Int J Pharm.* 2013;454:695-702.
14. Ning M, Gu Z, Pan H, Yu H, Xiao K. Preparation and in vitro evaluation of liposomal/niosomal delivery systems for antifungal drug clotrimazole. *Indian J Exp Biol.* 2005;43:150-7.
15. Pavelic Z, Skalko-Basnet N, Jaksenjak I. Characterization and in vitro evaluation of bioadhesive liposome gels for local therapy of vaginitis. *Int J Pharm.* 2005;301:140-8.
16. Shahin M, Hady SA, Hammad M, Mortada N. Novel jojoba oil-based emulsion gel formulations for clotrimazole delivery. *AAPS PharmSciTech.* 2011;12(1):239-47.
17. Santos SS, Lorenzoni A, Pegoraro NS, Denardi LB, Alves SH, Schaffazick SR, et al. Formulation and in vitro evaluation of coconut oil-core cationic nanocapsules intended for vaginal delivery of clotrimazole. *Colloids Surf B: Biointerfaces.* 2014;116:270-6.
18. Tonglairoum P, Ngawhirunpat T, Rojanarata T, Panomsuk S, Kaomongkolgit R, Opanasopit P. Fabrication of mucoadhesive chitosan coated polyvinylpyrrolidone/cyclodextrin/clotrimazole sandwich patches for oral candidiasis. *Carbohydr Polym.* 2015;132:173-9.
19. Schmidt T, Dobler D, Schlupp P, Nising C, Garn H, Runkel F. Development of multiple W/O/W emulsions as dermal carrier system for oligonucleotides: effect of additives on emulsion stability. *Int J Pharm.* 2010;398(1-2):107-13.
20. Silva A, Grossiord JL, Puiseux F, Seiller M. Insulin in W/O/W multiple emulsions: preparation, characterization and determination of stability towards proteases in vitro. *J Microencap.* 1997;14(3):311-9.
21. Villar AM, Naveros BC, Campmany AC, Trends MA, Rocabert CB, Bellowa LH. Design and optimization of self-nanoemulsifying drug delivery systems (SNEDDS) for enhanced dissolution of gemfibrozil. *Int J Pharm.* 2012;431(1-2):161-75.
22. Celia C, Trapasso E, Cosco D, Paolino D, Fresta M. Turbiscan® Lab Expert analysis of the stability of ethosomes and ultra-deformable liposomes containing a bilayer fluidizing agent. *Colloids Surf B: Biointerfaces.* 2009;72:155-60.
23. Florence AT, Whitehill D. Formulation and stability of multiple emulsions. *Int J Pharm.* 1982;11:277-308.
24. Jiang J, Mei Z, Xu J, Sun D. Effect of inorganic electrolytes on the formation and the stability of water-in-oil (W/O) emulsions. *Colloids Surf A.* 2013;429:82-90.
25. Muscholk G. Multiple emulsions for food use. *Curr Opin Colloid Interface Sci.* 2007;12:213-20.
26. Olivieri L, Seiller M, Bromberg L, Bestard M, Duong TN, Grossiord JL. Optimization of a thermally reversible W/O/W multiple emulsion for shear-induced drug release. *J Control Release.* 2003;88(3):401-12.
27. Tedajo GM, Seiller M, Prognon P, Grossiord JL. pH compartmented w/o/w multiple emulsion: a diffusion study. *J Control Release.* 2001;75(1-2):45-53.
28. Tang SY, Manickam S, Billa N. Impact of osmotic pressure and gelling in the generation of highly stable single core water-in-oil-in-water (W/O/W) nano multiple emulsions of aspirin assisted by two-stage ultrasonic cavitation emulsification. *Colloids Surf B: Biointerfaces.* 2013;102:653-8.
29. Geiger S, Tokgoz S, Fruchus A, Jager-Lezer N, Seiller M, Lacombe C, et al. Kinetics of swelling-breakdown of a w/o/w multiple emulsion: possible mechanisms for the lipophilic surfactant effect. *J Control Release.* 1998;52(1-2):99-107.
30. Souto EB, Wissing SA, Barbosa CM, Müller RH. Development of a controlled release formulation based on SLN and NLC for topical clotrimazole delivery. *Int J Pharm.* 2004;278:71-7.
31. Pal R. Rheology of simple and multiple emulsions. *Curr Opin Colloid Interface Sci.* 2011;16:41-60.
32. Krishnaiah YS, Xu X, Rahman Z, Yang Y, Katragadda U, Lionberger R, et al. Development of performance matrix for generic product equivalence of acyclovir topical creams. *Int J Pharm.* 2014;475(1-2):110-22.
33. Kawashima Y, Hino T, Takeuchi H, Niwa T, Horibe K. Rheological study of w/o/w emulsions by a cone-and-plate viscometer: negative thixotropy and shear-induced phase inversion. *Int J Pharm.* 1991;72(1):65-77.
34. Silva AC, Amaral MH, González-Mira E, Santos D, Ferreira D. Solid lipid nanoparticles (SLN)-based hydrogels as potential carriers for oral transmucosal delivery of risperidone: preparation and characterization studies. *Colloids Surf B: Biointerfaces.* 2012;93:241-8.
35. El-Hadidy GN, Ibrahim HK, Mohamed MI, El-Miligi MF. Microemulsions as vehicles for topical administration of voriconazole: formulation and in vitro evaluation. *Drug Dev Ind Pharm.* 2012;38(1):64-72.
36. Schramm G. A practical approach to rheology and rheometry. 2nd ed. Germany: Gebrüder Haake; 1994.
37. Korhonen M, Lehtonen J, Hellen L, Hirvonen J, Yliruusi J. Rheological properties of three component creams containing sorbitan monoesters as surfactants. *Int J Pharm.* 2002;247(1-2):103-14.
38. Wen L, Papadopoulos KD. Osmotic pressure on water transport in w1/o/w2 emulsions. *J Coll Interface Sci.* 2001;235:398-404.

Formulation coded series and composition of Multiple W/O/W emulsions (percentage, w/w)

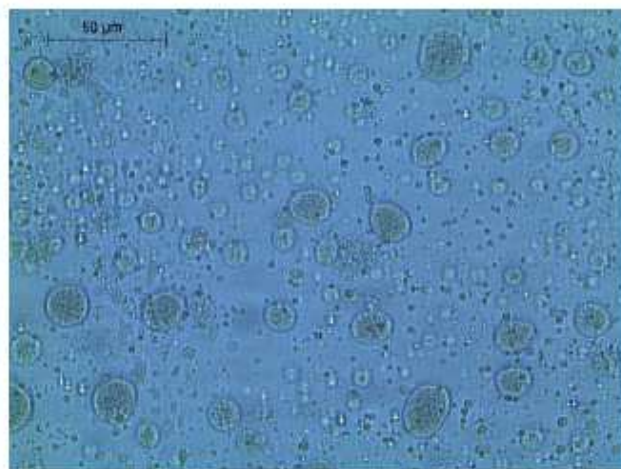
COMPOSITION	FORMULATION CODED SERIES																	
	CAPRIC/CAPRYLIC TRYGLICERIDE						JOJOBA OIL						ISOPROPYL MYRISTATE					
	JMLP 01	JMLP 02	JMLP 03	JMLP0 1T	JMLP0 2T	JMLP0 3T	JMYB 01	JMYB 02	JMYB 03	JMYB0 1T	JMYB0 2T	JMYB0 3T	JMIM 01	JMIM 02	JMIM 03	JMIMO 1T	JMIMO 2T	JMIMO 3T
<b>Oil phase</b>																		
Clotrimazole	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
Abil® EM 90 (cetyl dimethicone copolyol)	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5
Span® 60 (sorbitan stearate)	2.00	3.00	4.00	2.00	3.00	4.00	2.00	3.00	4.00	2.00	3.00	4.00	2.00	3.00	4.00	2.00	3.00	4.00
Labraphac® Lipophile 1349 (LP)	11.00	11.00	11.00	11.00	11.00	11.00	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Jojoba oil (YB)	-	-	-	-	-	-	11.00	11.00	11.00	11.00	11.00	11.00	-	-	-	-	-	-
Isopropyl Myristate (IM)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	11.00	11.00	11.00	11.00	11.00	11.00
Cetyl palmitate	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00
<b>Internal aqueous phase</b>																		
Sodium chloride	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25
Deionized water	32.25	31.25	30.25	32.25	31.25	30.25	32.25	31.25	30.25	32.25	31.25	30.25	32.25	31.25	30.25	32.25	31.25	30.25
<b>External aqueous phase</b>																		
Tego® Betain F (cocamidopropyl betaine)	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7
Tego® carbomer 341 ER (carbomer)	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
Tween® 80 (polysorbate 80)	-	-	-	1.00	1.00	1.00	-	-	-	1.00	1.00	1.00	-	-	-	1.00	1.00	1.00
Deionized water	49.00	49.00	49.00	48.00	48.00	48.00	49.00	49.00	49.00	48.00	48.00	48.00	49.00	49.00	49.00	48.00	48.00	48.00

Physicochemical properties at different times and temperatures. UNS: unstable, rt: room temperature  
D[4,3]: volume-weighted mean diameter.

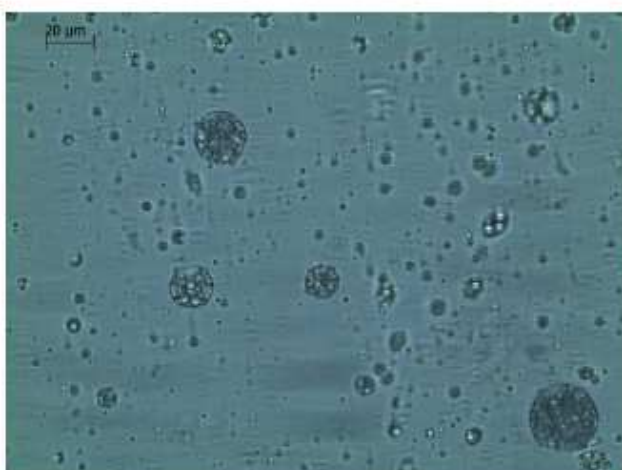
Form. code	Oil Phase				A <sub>2</sub>	Phys/ App	Viscosity (mPa.s)		Droplet Size (µm)		pH*				Conductivity* (µS/cm)				Drug content (%)
	LP	YB	IM	Sp 60			Tw 80	at 10 s <sup>-1</sup>	at 100 s <sup>-1</sup>	t <sub>48h</sub>	t <sub>180 days</sub>	t <sub>24h</sub>	t <sub>24h</sub>	t <sub>180 days</sub>	t <sub>180 days</sub>	t <sub>24h</sub>	t <sub>24h</sub>	t <sub>180 days</sub>	
					at rt	at 40 °C						at rt	at 40 °C	at rt	at 40°C	at rt	at 40°C		
JMLP01	1%			2%		+++ / +++	2425±27	492±6	40.4 ± 0.3	38.2 ± 0.1	6.42 ± 0.01	6.52 ± 0.01	6.15 ± 0.02	6.01 ± 0.04	198.3 ± 6.5	249.3 ± 4.5	219.3 ± 7.1	269.4 ± 8.3	97,47%
JMLP01T	1%			2%	1%	+++ / +++	84 ± 12	24 ± 2	31.2 ± 0.2	30.1 ± 0.3	6.65 ± 0.01	6.74 ± 0.01	6.4 ± 0.01	5.50 ± 0.05	256.7 ± 3.2	299.7 ± 3.2	278.7 ± 18.4	UNS	96,88%
JMLP02	1%			3%		+++ / +++	50 ± 9	144 ± 1	61.0 ± 3.1	63.1 ± 3.1	6.73 ± 0.07	6.61 ± 0.06	6.32 ± 0.01	6.01 ± 0.01	305.8 ± 10.5	221.8 ± 9.5	303.7 ± 14	UNS	95,06%
JMLP02T	1%			3%	1%	+++ / +++	926 ± 13	183 ± 1	82.5 ± 3.6	72.1 ± 1.4	6.80 ± 0.03	6.79 ± 0.01	6.27 ± 0.01	6.22 ± 0.02	275.8 ± 5.3	381.8 ± 2.3	292.0 ± 6.4	UNS	96,75%
JMLP03	1%			4%		+++ / +++	2408 ± 31	3959 ± 3	134.1 ± 3.1	122.5 ± 2.5	7.04 ± 0.03	7.1 ± 0.03	6.58 ± 0.01	6.92 ± 0.03	281.3 ± 6.1	325.6 ± 7.1	292.0 ± 7.1	339.5 ± 8.4	92,69%
JMLP03T	1%			4%	1%	+++ / +++	1136 ± 19	274 ± 4	124.0 ± 5.2	144.5 ± 8.7	6.23 ± 0.04	6.2 ± 0.01	6.13 ± 0.01	5.93 ± 0.01	290.9 ± 3.5	325.0 ± 6.5	309.0 ± 3.5	360.5 ± 6.5	96,16%
JMYB01		1%		2%		+++ / ++	3882 ± 40	750 ± 8	60.7 ± 1.8	53.9 ± 2.5	6.41 ± 0.04	6.55 ± 0.02	6.49 ± 0.03	6.18 ± 0.06	352.6 ± 4.1	82.6 ± 1.1	287.6 ± 2.5	UNS	93,62%
JMYB01T		1%		2%	1%	+++ / ++	120 ± 19	243 ± 5	30.4 ± 0.4	26.0 ± 3.0	6.62 ± 0.01	6.72 ± 0.01	6.65 ± 0.03	6.61 ± 0.08	300.9 ± 0.9	401.9 ± 8.9	307.3 ± 0.6	426.7 ± 3.6	86,87%
JMYB02		1%		3%		+++ / ++	5284 ± 57	1187 ± 18	99.8 ± 5.6	62.0 ± 4.9	6.67 ± 0.06	6.47 ± 0.20	6.45 ± 0.01	6.20 ± 0.14	331.7 ± 3.9	350.7 ± 6.9	296.7 ± 0.7	UNS	95,95%
JMYB02T		1%		3%	1%	+++ / ++	1389 ± 20	292 ± 6	34.6 ± 0.7	32.0 ± 0.9	6.59 ± 0.04	6.65 ± 0.02	6.46 ± 0.01	6.18 ± 0.02	301.5 ± 4.5	410.5 ± 8.5	325.0 ± 5.7	412.5 ± 6.6	92,02%
JMYB03		1%		4%		+++ / ++	5980 ± 78	2427 ± 15	68.5 ± 2.8	60.0 ± 0.5	6.60 ± 0.02	6.62 ± 0.01	6.47 ± 0.04	6.32 ± 0.01	250.6 ± 4.9	369.8 ± 8.9	313.3 ± 4.7	400.9 ± 5.6	90,16%
JMYB03T		1%		4%	1%	+++ / ++	2093 ± 30	343 ± 9	28.1 ± 1.0	25.8 ± 1.6	6.68 ± 0.01	6.67 ± 0.01	6.64 ± 0.01	6.20 ± 0.01	278.9 ± 1.5	401.5 ± 10.5	289.7 ± 2.9	425.0 ± 4.8	88,39%
JMIM01			1%	2%		+++ / ++	657 ± 7	137 ± 1	37.8 ± 0.3	38.7 ± 0.4	6.71 ± 0.02	6.68 ± 0.02	6.75 ± 0.01	6.69 ± 0.07	260.5 ± 2.1	125.5 ± 4.1	280.3 ± 2.5	UNS	96,07%
JMIM01T			1%	2%	1%	+++ / ++	333 ± 3	102 ± 0	30.1 ± 0.9	27.7 ± 1.1	6.81 ± 0.01	6.78 ± 0.03	6.77 ± 0.03	6.04 ± 0.04	290.5 ± 1.3	99.5 ± 5.8	291.0 ± 0.9	UNS	85,64%
JMIM02			1%	3%		+++ / ++	190 ± 21	278 ± 2	41.6 ± 0.4	40.9 ± 0.7	6.59 ± 0.01	6.56 ± 0.01	6.55 ± 0.02	6.33 ± 0.01	241.5 ± 1.9	351.6 ± 9.9	260.7 ± 1.5	400.8 ± 10.5	93,67%
JMIM02T			1%	3%	1%	+++ / ++	943 ± 18	199 ± 9	33.4 ± 3.0	29.7 ± 2.9	6.72 ± 0.02	6.66 ± 0.01	6.73 ± 0.01	UNS	268.7 ± 8.9	98.7 ± 11.5	269.6 ± 3.1	UNS	87,29%
JMIM03			1%	4%		UNS	UNS	UNS	UNS	UNS	UNS	UNS	UNS	UNS	UNS	UNS	UNS	UNS	UNS
JMIM03T			1%	4%	1%	UNS	UNS	UNS	UNS	UNS	UNS	UNS	UNS	UNS	UNS	UNS	UNS	UNS	UNS



JMLP01 (90 days)



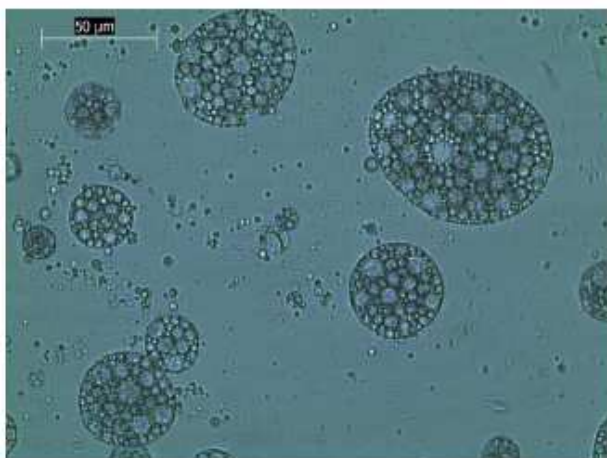
JMLP01 (120 days)



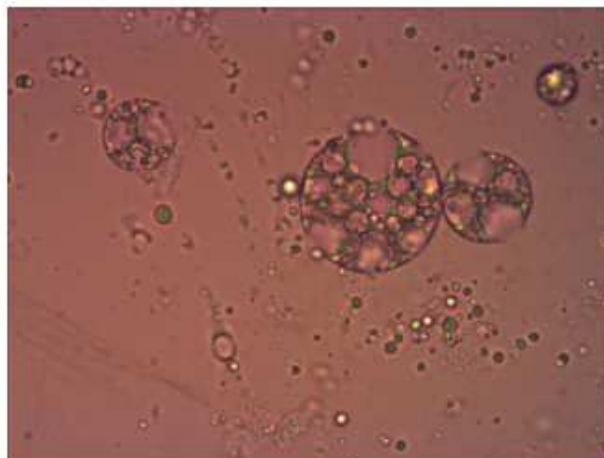
JMLP02 (90 days)



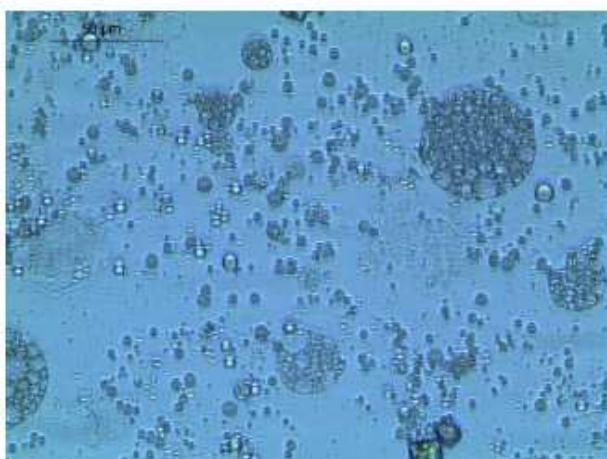
JMLP03 (180 days)



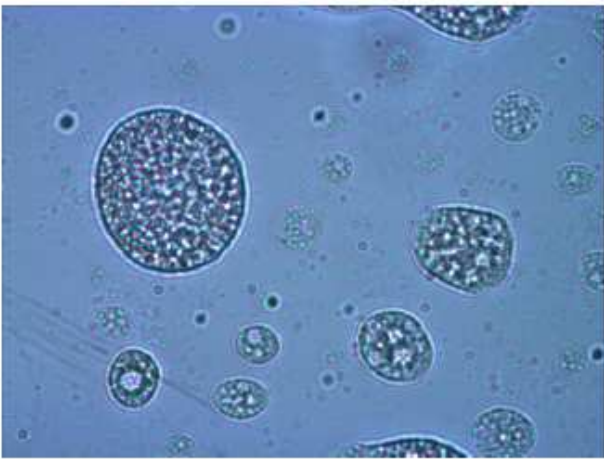
**JMLP01 (180 days)**



**JMYB01 (180 days)**



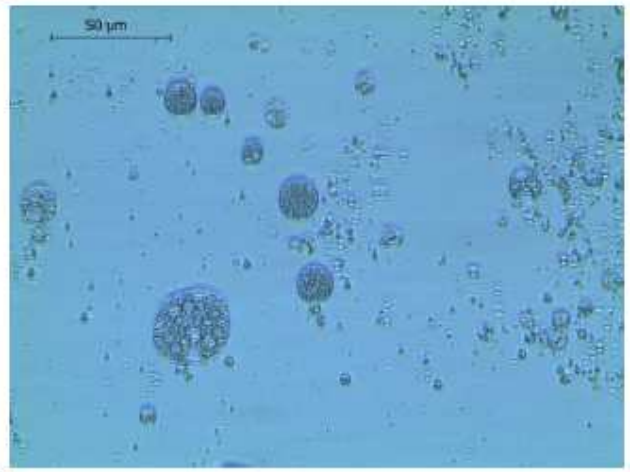
**JMYB03 (180 days)**



**JMIM01 (180 days)**

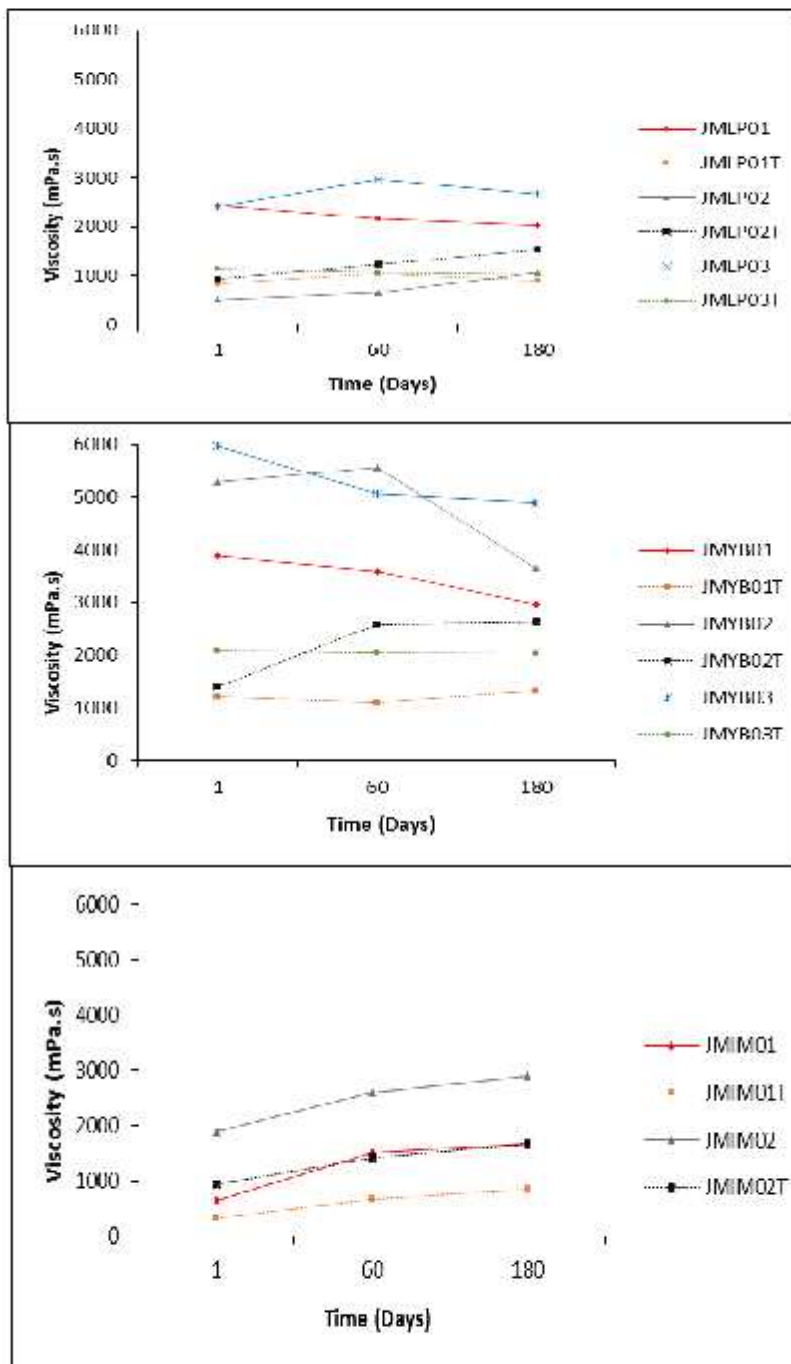


JMIM01T (180 days)



JMIM02 (180 days)

Viscosity changes during storage at 25 °C of multiple O/W/O emulsions



“SKIN PERMEATION OF ECONAZOLE  
NITRATE FORMULATED IN AN ENHANCED  
HYDROPHILIC MULTIPLE EMULSION”.

---

“Permeació del nitrat d’econazol en pell en una  
emulsió múltiple hidrofílica millorada”.

J. Suñer-Carbó, A. Boix-Montañés, L. Halbaut-Bellowa, N. Velázquez-Carralero, J. Zamarbide-Losada, N. Bozal-de-Febrer, A.C. Calpena-Campmany.

*Mycoses.*

2017. Vol 60 (3) , 166-177.

**ARTICLE II**



## Article II:

# “SKIN PERMEATION OF ECONAZOLE NITRATE FORMULATED IN AN ENHANCED HYDROPHILIC MULTIPLE EMULSION”.

## Resum:

L'alliberació de fàrmacs antifúngics d'aplicació tòpica local esta molt limitada per l'extrema liposolubilitat dels seus principis actius. Una emulsió múltiple de nitrat d'econazol al 1% s'ha comparat amb una formulació comercial de referència.

Les emulsions múltiples (ME) són un potencial vehicle per millorar l'alliberament de nitrat de econazol (ECN), un antifúngic destinat a infeccions fúngiques epidèrmiques. L'emulsió múltiple de nitrat d'econazol al 1% es compara amb una formulació comercial en aspectes com la reologia, mida de gota i de l'activitat antifúngica *in vitro* contra espècies de *Candida*. L'alliberament *in vitro* del principi actiu, la permeació en pell humana i la retenció de fàrmac s'han investigat utilitzant cèl·lules de difusió vertical tipus *Franz*.

L'anàlisi reològica va demostrar un comportament pseudoplàstic no-newtonià amb propietats reofluidificants i tixotropia. No es van observar variacions significatives de la mida de partícula durant l'emmagatzematge durant 6 mesos. Les dues formulacions van mostrar nivells similars d'alliberament aconseguint valors asimptòtics en 5 h. Els nivells de permeació en pell d'econazol de l'emulsió múltiple han estat significativament superiors als de la formulació comercial, atribuïble a diferències en la polaritat dels components i els excipients de la formulació. Per contra, s'han obtingut nivells d'acumulació de fàrmac similars a la pell (40 a 130 ppm). Aquestes concentracions han estat comparades amb els valors obtinguts de MIC (de 2 a 78 ppm), confirmant l'eficàcia antimicrobiana *in vitro* de les dues formulacions. Una retenció de la pell similar i una taxa de penetració més alta sobre les formulacions existents és considera un enfocament millorat per dirigir el fàrmac a l'epidermis profunda.

L'emulsió múltiple proposada comporta una eficàcia antimicrobiana idèntica que la formulació comercial assajada, però les propietats reològiques de l'emulsió múltiple milloren en la textura i en l'extensibilitat per la qual cosa aquesta farà millorar l'adherència al tractament.

# Skin permeation of econazole nitrate formulated in an enhanced hydrophilic multiple emulsion

Joaquim Suñer-Carbó<sup>1</sup> | Antonio Boix-Montañés<sup>1</sup> | Lyda Halbaut-Bellowa<sup>1</sup> |  
Nelvis Velázquez-Carralero<sup>1</sup> | Joanna Zamarbide-Ledesma<sup>1</sup> | Nuria Bozal-de-Febrer<sup>2</sup> |  
Ana Cristina Calpena-Campmany<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Pharmacy and Pharmaceutical Technology and Physical Chemistry, Faculty of Pharmacy and Food Sciences, University of Barcelona, Barcelona, Spain

<sup>2</sup>Department of Microbiology, Faculty of Pharmacy and Food Sciences, University of Barcelona, Barcelona, Spain

## Correspondence

Antonio Boix-Montañés, Biopharmaceutics and Pharmacokinetics Unit, Department of Pharmacy and Pharmaceutical Technology and Physical Chemistry, Faculty of Pharmacy and Food Sciences, University of Barcelona, Barcelona, Spain.  
Email: antoniboix@ub.edu

## Summary

Local delivery of imidazolic antifungals is limited by its extreme lipophilicity. Multiple emulsions (ME) are a potential vehicle to enhance the delivery of econazole nitrate (ECN), an antifungal targeted to deep-seated epidermal yeast infections. An 1% ECN hydrophilic ME was compared with a commercial formulation in terms of rheology, droplet size and in vitro antifungal activity against *Candida* species. Comparative in vitro drug release, human skin permeation and drug retention were investigated using vertical diffusion cells. Rheology demonstrated a pseudoplastic shear thinning with thixotropy facilitating skin residence. No significant aggregation or droplet size variations were observed during a 6-month stability storage. Both formulations exhibited similar release levels achieving asymptotic values in 5 h. ECN skin permeation levels from the multiple emulsion resulted to be significantly higher than those of the commercial formulation, attributable to differences in formulation polarity and excipients composition. Conversely, similar drug accumulation levels in skin were obtained (40–130 ppm). These concentrations resulted to be comparable with obtained MIC values (2–78 ppm), confirming the in vitro antimicrobial efficacy of both formulations. A similar skin retention and a higher permeation rate over the existing formulations is considered an improved approach to target the drug to deep epidermis.

## KEYWORDS

antifungal delivery, candidiasis, drug release, skin permeation, W/O/W multiple emulsion

## 1 | INTRODUCTION

Imidazolic antifungal drugs are indicated for the treatment of yeast external infections, widespread diseases which range from superficial skin or mucosal infections to invasive and disseminated infections.<sup>1,2</sup> Formulations for local therapy are desirable to achieve the highest drug penetration into deep epidermis, the site of action. Nevertheless, these drugs are markedly lipophilic and largely retained in the stratum corneum (SCR)<sup>3</sup> difficulting the treatment of deep-seated epidermal infections. Concerning mucosal administration, formulations suffer oftenly from poor retention at the target site, so it is also interesting to

optimise the adhesion and rheology of those formulations for a better drug permeation.

Some formulation strategies can solve these limitations, for example, liposomal formulations or lipid nanocarriers.<sup>4,5</sup> In particular, multiple emulsions (ME) allow the vehiculisation of lipophilic substances inside an aqueous external-phase formulation that releases the drug from the inner phases.<sup>6</sup> These emulsions are complex systems formed by phase inversion of a simple emulsion.<sup>7</sup> As an example, W/O/W emulsions consist of an hydrophilic disperse system of a lipophilic phase containing inside smaller hydrophilic droplets similar to the external continuous phase. In other words, internal and external aqueous

phases are separated by an oily phase that can dissolve the lipophilic drug. Common difficulties of ME formulation are the stabilisation of the internal W/O emulsion and the achievement of an equilibrated combination of volume fractions. Nowadays, polymeric emulsifiers<sup>8</sup> provide a strong, thick and well-defined film around the W/O interface.

General advantages of W/O/W multiple emulsions are the protection of the entrapped drug, their ability to vehiculise different actives in the different emulsion phases or their sustained release effects.<sup>9</sup> They have been widely applied in various fields of pharmacy<sup>10–12</sup> such as vaccines adjuvants,<sup>13</sup> vehicles for anticancer agents,<sup>14</sup> prolonged drug delivery systems<sup>4,15</sup> or taste-masking agents.<sup>16</sup>

Relating imidazolic antifungals, econazole nitrate (ECN) is highly effective against *Candida albicans*.<sup>17</sup> It is very slightly soluble in water (1.48 µg/mL) and soluble in methanol<sup>18,19</sup> and surfactants such as Tween® 80 (>10 mg/mL).<sup>20</sup> It has a partition coefficient (logP) of about 5.5 and a pKa of 6.6 (strongest basic).<sup>21,22</sup> Commercial formulation of topical ECN consists of a 1% cream made up by different macrogols and liquid paraffin where the drug cannot be completely dissolved and is partially suspended.<sup>20</sup> This formulation is applied over skin or mucosa twice a day during a minimum of two weeks depending on its therapeutic indication.<sup>23</sup> Given the large duration of treatment and the frequent administration requirements, the aim of this study was to investigate the effect of solubilisers-containing multiple emulsion over the ECN skin permeation and penetration searching for a better patient-compliant formulation.

In general, azole antifungals tend to be highly lipophilic and they can readily partition into the lipid-rich intracellular space of the SCR. The challenge is to develop a stable formulation that facilitates drug penetration into deep epidermis. In this sense, rheological characteristics have been enhanced maintaining the high release levels and the in vitro antimicrobial activity against *Candida* species of a commercial formulation.

## 2 | MATERIALS AND METHODS

### 2.1 | Materials

Econazole nitrate (ECN) was supplied by Acofarma Distribucion, S.A (Terrassa, Spain). Diethyleneglycol monoethyl ether (Transcutol® P), medium chain triglycerides (Labraphac® Lipophile 1349) were a gift from Gattefossé, S.A (Saint-Priest, France). Cetyl dimethicone copolyol (Abil® EM 90), cocamidopropyl betaine (Tego® Betain F) and carbomer (Tego® Carbomer 341 ER) were supplied by Evonik Degussa (Essen, Germany). RPMI-1640 synthetic medium 2% G containing glutamine, pH indicator without bicarbonate and glucose and Sabouraud dextrose agar were supplied by Invitrogen (Madrid, Spain). Methanol HPLC grade was obtained from Fisher Scientific (Madrid, Spain). Sodium dodecyl sulphate, sodium hydroxide and potassium monohydrogen phosphate were obtained from Panreac (Barcelona, Spain). Hank's stock solution was obtained from ThermoFisher Scientific (Barcelona, Spain). Deionised water, with a conductance lower than 0.07 mS/cm, was prepared on-site. Nylon and polysulfone membranes were supplied by Waters Corporation (Milford, MA, USA) and

Pall Corporation (Gelman Sciences, Ann Arbor, MI, USA) respectively. Commercial formulation of 1% econazole nitrate available in the Spanish market (Ecotam®, Sesderma SL) was used as a comparable formulation.

### 2.2 | Preparation of multiple emulsions

Previous formulation studies<sup>24</sup> led us the optimisation of a water in oil in water (W/O/W) basis able to vehiculise ECN dissolved at 1%. Based on those results, two multiple emulsions were prepared: a drug dispersed ME and its corresponding placebo. Preparation was based on a two-step emulsification process.<sup>25</sup> The first emulsification consisted of a W/O primary emulsion. The second emulsification dispersed equal parts of the primary emulsion (W/O) and an external aqueous phase containing both an hydrophilic emulsifier and a thickening agent (cf. Table 1).

#### 2.2.1 | Preparation of primary emulsion

Internal W/O emulsion was prepared by slow addition of a preheated (80 ± 2°C) aqueous solution of NaCl (W<sub>1</sub>) to an oily phase (O<sub>1</sub>) containing the lipophilic emulsifiers (cetyl dimethicone copolyol and diethyleneglycol monoethyl ether) and also capric/caprylic triglyceride preheated to the same temperature, that allowed the dissolution of ECN. Mechanical stirring (Schott Iberica, Barcelona, Spain) was maintained at 500 rpm until cooling to 25°C.

#### 2.2.2 | Preparation of W/O/W emulsion

In a second stage, the W<sub>1</sub>/O<sub>1</sub> emulsion was slowly added to an equal amount of external aqueous phase (W<sub>2</sub>) at 250 rpm at room temperature. This W<sub>2</sub> phase was previously prepared dispersing at room

**TABLE 1** Percentage composition (w/w) of the formulation basis of econazole nitrate multiple emulsion

Components	Percentage composition (%)
<b>Oily phase (O<sub>1</sub>)</b>	
Econazole nitrate (ECN)	1.00
Cetyl dimethicone copolyol (CDC, Abil® EM 90)	1.50
Diethyleneglycol monoethyl ether (Transcutol® P)	2.00
Capric/caprylic triglyceride (Labraphac® lipophile 1349)	11.00
<b>Internal aqueous phase (W<sub>1</sub>)</b>	
Sodium chloride	0.25
Purified water at pH 6.5–7.0	34.25
<b>External aqueous phase (W<sub>2</sub>)</b>	
Carbomer (Tego® Carbomer 341)	0.20
Cocamidopropyl betaine (Tego® Betaine F)	0.70
Purified water at pH 6.5–7.0	49.10*

\*In case of placebo formulation, drug amount was corrected with water.

temperature the cross-linked polyacrylic polymer (carbomer) in a dissolution of the hydrophilic emulsifier (cocamidopropyl betaine) in deionised water. Complete dissolution of carbomer was achieved by 24 h. Afterwards, neutralisation of the carboxylic groups was carried out using 10% sodium hydroxide solution until pH 6.5–7.0. After complete addition of the primary W/O emulsion over this gelified aqueous phase, paddle stirring was prolonged for 10 min until complete formation of an homogeneous W/O/W multiple emulsion.

### 2.3 | Macro- and microscopic analyses

Macroscopic organoleptic characteristics were studied to detect any visible sign of instability such as creaming, phase separation or colour changes. Formulations were also investigated by microscopic analysis to evaluate their homogeneity degree and droplet size. Multiple W/O/W emulsions were examined using an optical Leica DM 1000 LED light microscope (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) and images were captured using a camera Leica EC3 (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) at  $\times 400$  magnifying power. Measurements were taken directly and also after carefully diluting samples (1:20) with water just ending formulation and monthly during a 6-month stability study.

### 2.4 | pH

pH was measured at room temperature (25°C) using a digital pH metre (Crison micropH 2000, Crison Instruments SA, Alella, Spain) with an emulsion electrode (viscous samples). Measurements were done in triplicate in ME samples, the outer aqueous phase ( $W_2$  viscous gel) and the commercial formulation. Tests were performed during ageing time for samples kept at room temperature. Mean, SD values are reported.

### 2.5 | Droplet size

Results of microscopic particle size were supplemented by laser diffractometry (LD) using a Malvern Mastersizer<sup>®</sup> 2000 with a sample dispersion unit (Malvern Instruments, Worcestershire, UK) yielding the volume distribution of the particles. Measurements were performed directly with the non-diluted formulations which were added to deionised water (dispersant) under stirring. The fundamental size distribution is based on volumes distribution and according to the Mie theory. The statistics of the distribution were calculated using the derived diameters  $D[m,n]$  as in Equation 1, an internationally agreed method of defining the mean and other moments of particle size.<sup>20</sup>

$$D(m,n) = \left[ \frac{\sum V_i d_i^{m-3}}{\sum V_i d_i^{n-3}} \right]^{\frac{1}{n-1}} \quad (1)$$

where  $m$  is the mode of quantitation (volume in our case) and  $n$  is the percentile of the distribution. For example,  $D[v,0.5]$  is the size in micrometres of the 50% of the volume droplets. This value is also known as the mass median diameter (MMD) or the median of the volume distribution. LD analysis reported also the  $D[v,0.1]$  and  $D[v,0.9]$ ,

standard percentile readings. Additionally, the following parameters were reported: Volume-surface mean diameter, that is the surface area moment mean diameter, named as  $D[3,2]$ , and volume-weighted mean diameter, or mass moment mean diameter, named as  $D[4,3]$  and calculated as:

$$D[4,3] = \frac{\sum n_i d_i^4}{\sum n_i d_i^3} \quad (2)$$

$$D[3,2] = \frac{\sum n_i d_i^3}{\sum n_i d_i^2} \quad (3)$$

where  $n_i$  is the number of particles with diameter  $d_i$ .

The average particle size distribution of the different formulations was analysed in triplicate after 24 h and after one month of preparation for samples stored at room temperature ( $25 \pm 5^\circ\text{C}$ ). Values were reported as the mean of at least three values, standard deviation (SD).

### 2.6 | Stability studies

A 3-month stability test in isothermal conditions was run at different storage conditions for the multiple emulsion. Test glass tubes were stored vertically kept at  $5 \pm 3^\circ\text{C}$ ,  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ ,  $40 \pm 2^\circ\text{C}$  in stability chambers (Heraeus B5042 E and I 42, Madrid, Spain). pH and visual measurements were checked each week during storage period such as precipitation of drug, phase separation, creaming or any other macroscopic change. Microscopic observations were performed at 24 h of preparation and each month during storage.

In addition, long-term (six months) physical stability was estimated using multiple light scattering with a Turbiscan<sup>®</sup> Lab Expert (Formulation, L'Union, France). This measurement quantifies the backscattering (BS) and/or transmission (T) of a pulsed near-infrared light source ( $\lambda = 880 \text{ nm}$ ) projected through the sample. The reading head consists of two synchronous optical detectors: A transmission detector receives the transmitted light through the sample ( $180^\circ$  from the incident radiation) and a backscattering detector that receives the light backscattered by the sample ( $135^\circ$  from the incident radiation). The formulations in this study were milky and opaque, preventing from the measurement of light transmission. Therefore, only BS profiles were used to predict the physical stability. Undiluted formulations ( $\sim 35 \text{ mL}$ ) were placed on a cylindrical glass measuring cell (sample cell length  $\sim 50 \text{ mm}$ ) which was completely scanned by the reading head. The entire sample cell length was scanned acquiring BS data each  $40 \mu\text{m}$  and each hour over a period of 24 h. A plot was produced with  $\Delta\text{BS}$  on the y-axis and the sample length on the x-axis. Measurements were performed at 24 h after preparation and also after six months of  $25^\circ\text{C}$  storage.

### 2.7 | Rheology

The rheological properties were studied at 24 h after preparation and at the end of the study after room temperature storage. Formulations were submitted to either a steady-state (rotational) or a dynamic (oscillatory) shear at  $25 \pm 0.1^\circ\text{C}$ . Rheological measurements were

performed using a Haake Rheostress 1 rheometer (Thermo Fischer Scientific, Karlsruhe, Germany) connected to a thermostatic circulator and using the HAAKE RHEOWIN<sup>®</sup> software (Thermo Electron Corporation, Karlsruhe, Germany) to execute the tests and data analysis.

### 2.7.1 | Rotational measurements

Steady-state tests were performed with a cone-and-plate geometry set-up (0.105 mm gap) with a fixed lower plate and a mobile Ti upper cone (Haake) (60 mm diameter, 2° angle). Measurements were performed, by triplicate, just after preparation ( $t = 0$ ) and monthly during storage at 25°C along the study. The shear stress ( $\tau$ ) and viscosity ( $\eta$ ) at  $25 \pm 0.1^\circ\text{C}$  were measured as a function of the shear rate  $\dot{\gamma}$ . The shear rate ramp programme included: Ramp-up from 0 to 100/s in 3 min, constant shear rate of 100/s during 1 min and Ramp-down from 100 to 0/s in 3 min.

Different mathematical models<sup>27</sup> were fitted to flow curves (when resulted to be non-Newtonian) to identify the model that provided the best fitting to the observed data: Bingham, Ostwald de Waele, Herschel-Bulkley, Casson and Cross. Equations are summarised in Table 2 where  $\tau$  is the shear stress (Pa),  $\dot{\gamma}$  is the shear rate (1/s),  $\eta$  is the dynamic viscosity (mPa/s),  $\tau_0$  is the yield shear stress (Pa),  $\eta_0$  is the zero shear rate viscosity,  $\eta_p$  is a constant plastic viscosity (mPa/s),  $\eta_\infty$  is the infinity shear rate viscosity,  $n$  is the flow index,  $K$  is the consistency index and  $\eta_p$  experimental parameter. Best fitting of mathematical models was based on the correlation coefficient value ( $r$ ).

Steady-state viscosity ( $\eta$ , Pa/s) was calculated from the constant shear phase at 100/s and also from the ramp-up period at 10/s. The "apparent thixotropy" (Pa/s) during the test was evaluated calculating the area of the hysteresis loop along the ramps.

### 2.7.2 | Dynamic oscillatory measurements

Oscillatory tests were performed with a parallel plate-and-plate geometry using the same rheometer described above (60 mm diameter, 0.5 mm gap separation between plates). Firstly, oscillatory stress sweep test were performed at a constant frequency of 1 Hz, to an increasing shear stress from 0.01 to 100 Pa in order to determine the linear viscoelastic region (LVR) of the samples. After the determination of LVR, frequency sweep test was carried out varying the frequency range within 0.01-10 Hz, at a constant shear rate within the

linear viscoelastic region (LVR) in order to determine the related variation in the storage modulus ( $G'$ ), loss modulus ( $G''$ ), phase angle ( $\delta$ ) and the complex viscosity ( $\eta^*$ ) that were used for sample characterisation. The relationship between  $G'$  and  $G''$ , and the complex viscosity ( $\eta^*$ ) are given by the following equations:

$$\tan \delta = \frac{G''}{G'} \quad (4)$$

$$\eta^* = \frac{G^*}{\omega} \quad (5)$$

where  $\omega$  is the angular frequency ( $\omega = 2\pi f$ ),  $f$  is the frequency and  $G^*$  is the complex modulus:

$$G^* = G' + iG'' \quad (i^2 = -1). \quad (6)$$

### 2.8 | Econazole assay

ECN concentration in stability and drug release samples was measured by UV-spectrophotometry at 201 nm (Thermo Spectronic Helios Beta, Thermo, Cambridge, UK). Validation was run according to standard guidelines<sup>28</sup> including: linearity, intraassay and interassay precision and accuracy. Calibration curves were prepared using the receptor solution of release studies (Methanol/ $\text{K}_2\text{HPO}_4$  75:25 v/v). Linearity was demonstrated between 2.61 and 10.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Accuracy resulted to be  $-2.98$  to  $+3.90\%$ . Concerning precision, maximum deviation of RSD was 2.86%. Recovery was tested in triplicate using a 1% ECN methanol solution resulting to be 96.3% (RSD 4.6%) and considered satisfactory for our purposes.

ECN content in the formulations was assayed as follows:<sup>28</sup> 500 mg sample was homogeneously dispersed in tetrahydrofuran and extracted with 5 mL methanol aided with ultrasounds (10 min) to break the dispersed system. After centrifugation (5000 rpm/30 min), the methanolic fraction was taken and the process was repeated two times. Collected fractions, diluted until a maximum expected concentration of 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , were filtered through 0.45  $\mu\text{m}$  Nylon disposable filters and read spectrophotometrically against an appropriate blank solution, for example, from a sample obtained with a placebo ME formulation or merely the solvent of calibration dilutions. Drug content (%) was calculated as the ratio between the experimental value and the total nominal concentration of ECN. Assay was done in triplicate for each formulation.

Otherwise, ECN concentration in the human skin permeation samples was quantified using a validated HPLC method with a Waters LC Module Plus<sup>®</sup> with UV-VIS 2487 detector (Waters, Milford, MA, USA) with a C18 column Microsorb<sup>®</sup> 5  $\mu\text{m}$ , 5.0 mm  $\times$  250 mm. The mobile phase consisted of methanol/0.05M  $\text{NH}_4\text{HPO}_4$  solution (85:15 v/v) at a flow rate of 1 mL/min at room temperature. The injection volume was 10  $\mu\text{L}$  and detection was monitored at 200 nm.<sup>4</sup>

Calibration curves were prepared using the mobile phase. Linearity was demonstrated between 3.125 and 100.00  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Accuracy resulted to be lower than  $+4.2\%$ . Concerning precision, maximum RSD was 1.6%.

Statistical calculations were carried out with the GRAPHPAD<sup>®</sup> PRISM 3 software (Graphpad Software, San Diego, CA, USA).

**TABLE 2** Flow curve models ( $\tau=f(\dot{\gamma})$ ) for mathematical fitting to viscosity experimental data

Function	Equation
Bingham	$\tau = \tau_0 + (\eta_p \cdot \dot{\gamma})$
Ostwald de-Waele	$\tau = K \cdot \dot{\gamma}^n$
Herschel-Bulkley	$\tau = \tau_0 + K \cdot \dot{\gamma}^n$
Casson	$\tau = \sqrt{(\tau_0^2 + (\eta_0 \cdot \dot{\gamma})^2)}$
Cross	$\tau = \dot{\gamma} \cdot [\eta_\infty + (\eta_0 - \eta_\infty) / (1 + (\dot{\gamma}/\dot{\gamma}_0)^n)]$

## 2.9 | Antimicrobial efficacy

Minimum inhibitory concentration (MIC) values of 1% ECN solution in DMSO, the ECN multiple emulsion, the ECN commercial formulation and a placebo multiple emulsion, were investigated against *Candida albicans* (ATCC® 10231), *Candida glabrata* (ATCC® 66032) and *Candida parapsilosis* (ATCC® 22019) following the broth microdilution (BMD) method of the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) applied to antifungal agents against glucose-fermenting yeast.<sup>28,29</sup> The yeast strains were first cultured on Sabouraud agar at 30°C for 48 h before testing. The inoculums were prepared by suspending colonies in sterile distilled water to achieve a density equivalent to 2 McFarland standards counted in a Neubauer Chamber (1 to 5.10<sup>5</sup> colony forming-unit, CFU/mL). Working suspension was prepared by diluting (1:10) the standardised suspension in sterile distilled water. The test was performed using microdilution plates. Serial dilutions from 1250 to 0.0011 µg/mL in RPMI-1640 medium were prepared (n = 22) for the following samples: (i) ECN ME and commercial formulation, (ii) placebos prepared in RPMI-1640 double strength, (iii) 1% ECN solution in DMSO (reference). The following controls were included at the end of each well series: A growth control (containing inoculum and RPMI medium) and a drug-free medium (containing only RPMI medium double strength). After incubation at 37°C at 24 h and 48 h, the microdilution plates were read with a microdilution plate reader Synergy-HT (Biotek, Winooski, VT, USA) at 620 nm and at 0, 24 and 48 h. Resulting MIC values reported the first positive value of each series.

## 2.10 | Drug release

In vitro ECN release was tested with vertical diffusion cells<sup>30</sup> (Vidrafoc, Barcelona, Spain) with a diffusion area of 2.54 cm<sup>2</sup>. Receptor solution was a well-stirred mixture of 12 mL methanol: Phosphate buffer 0.05 M (75:25) at 32 ± 0.5°C satisfying sink conditions for econazole nitrate.

At first, two types of artificial membranes, nylon and polysulfone, were evaluated with a 20 µg/mL solution of ECN to select the best suitable one. Nylon membrane was selected as being the most permeable (lipophilic) one. Afterwards, comparative release profiles through nylon membrane were obtained in triplicate for ME and the commercial formulation using ca. 300 mg of formulation in the donor compartment. At different scheduled times during 24 h, 300 µL samples of receptor compartment were collected with fresh solution replacement and immediate spectrophotometric analysis.

Different release equations reported in the literature<sup>31</sup> (cf. Table 3) were fitted to the cumulative amounts of released ECN using a non-linear regression routine (WINNONLIN Software, version 3.3, Pharsight Corporation, Apex, NC, USA). Release rate was expressed with the corresponding rate constants. Selection of the best model was based on the minimum value of the Akaike's information criteria (AIC).<sup>32</sup>

In addition to this model fitting, two additional parameters were calculated using WINNONLIN® software: Predicted released amounts at the end of the experiment ( $Q_{max}$ ) expressed as percentage of the

**TABLE 3** Release equations ( $Q_t = f(t)$ ) fitted to the experimental data.  $Q_t$  is the amount of drug dissolved in time  $t$ ,  $Q_{max}$  is the maximum released amount of drug (asymptotic),  $K_0$  the zero-order release constant,  $K_1$  the hyperbolic rate constant,  $K$  the first-order rate constant and  $K_{2Q}$  the Higuchi rate constant

Function	Equation
Zero order	$Q_t = K_0 \cdot t$
Hyperbolic	$Q_t = Q_{max} \cdot t / (K_1 + t)$
First order	$Q_t = Q_{max} \cdot (1 - e^{-Kt})$
Square root	$Q_t = K_{2Q} \cdot t^{1/2}$

entrapped drug content of each formulation and the area under the cumulative curve of released amounts until the first asymptotic time for both formulations.

## 2.11 | Human skin permeation

ECN permeation from both formulations was investigated to calculate the permeation flux and the skin retention. Skin was obtained from leftovers of abdominal plastic surgery (Hospital de Barcelona, SCIAS, Barcelona, Spain). The experimental protocol was approved by the Bioethics Committee of the "Hospital de Barcelona" (Barcelona, Spain) and written informed consent forms were provided to skin donors. After surgical excision, skin was debrided and placed in containers with Hank's solution, transferred to the laboratory and frozen -20°C for storage. Prior to the experiment, skin was partially defrosted and laminar samples (400 µm) were obtained using an electrical dermatome (Aesculap GA 630, Tuttlingen, Germany). Experiments were done in triplicate. Skin specimens were immersed in physiological serum and mounted on vertical diffusion cells<sup>30</sup> (Vidrafoc, Barcelona, Spain) with 0.64 cm<sup>2</sup> effective diffusion area. Receptor compartment (4.5 mL) was filled up with a solution of Ethanol/Transcutol® P/Water (50:20:30 v/v/v), satisfying sink conditions. After temperature equilibration at 32°C, experiment was initiated applying 300 mg formulation to the donor compartment. A quantity of 300 µL samples were taken with replacement at predefined times during one day.

Drug concentrations were quantitated as previously described and used to calculate the cumulative amounts of permeated ECN per unit area ( $Q_t$ ). Permeation extent of ECN was described using the permeated values at last time ( $Q_{24}$ ). Permeation flux ( $J$ ) was calculated by linear regression between the cumulative permeated amounts per unit surface area and time in the linear phase.

At the end of each experiment, skin samples were removed from the diffusion cell, rinsed two times with an aqueous solution of 0.5% sodium dodecyl sulphate and finally deionised water. Resulting skin specimens were blotted dry, weighted and minced for extraction.

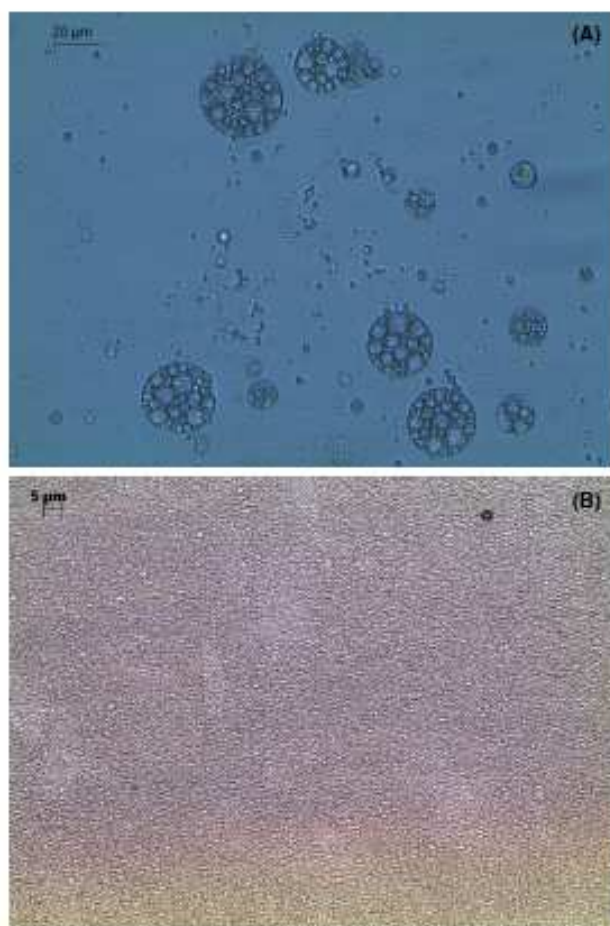
Drug extraction was done adding 1 mL of fresh receptor solution to each minced skin sample. After 10 min of cold sonication, liquid was recovered iterating the process. Resulting solutions were collected and centrifuged (1500 rpm, 10 min). Drug levels were quantified by HPLC (human skin). Results were reported as the mean, SD value of the percentage between the amount of drug in each sample and the weight of

skin sample. Regression analysis and statistical comparisons were carried out by one-way analysis of variance (ANOVA) using the GRAPHPAD® PRISM 3 software (Graphpad Software, San Diego, CA, USA) ( $\alpha = 0.05$ ).

### 3 | RESULTS

#### 3.1 | Droplet size

The structure of W/O/W multiple emulsions was confirmed by optical microscopy. An example is shown in Figure 1A. The size of the internal droplets (primary W/O emulsion) was in the range of 1 to 10  $\mu\text{m}$  approximately. The diameter of multi-globules ranged around 10–200  $\mu\text{m}$  and were confirmed later by laser diffractometry. Within experimental uncertainty, both diameter ranges remained invariable over the whole-storage period suggesting the absence of external and internal coalescence. Droplets of commercial formulation ranged about 5  $\mu\text{m}$  (Figure 1B). Under polarised light, some refringent particles were observed confirming that part of the drug was present in suspended form.



**FIGURE 1** A, Photomicrographs of multiple emulsion at 24 h of preparation at 400 $\times$  magnification. ME was diluted at 1:20. B, Photomicrographs of a commercial formulation at 24 h of preparation at 400 $\times$  magnification

Concerning laser diffractometry, mean values of volume-weighted mean diameter (D[4,3]), volume-surface mean diameter (D[3,2]) and D(v,0.1), D(v,0.5) and D(v,0.9), with their respective standard deviations are shown in Table 4.

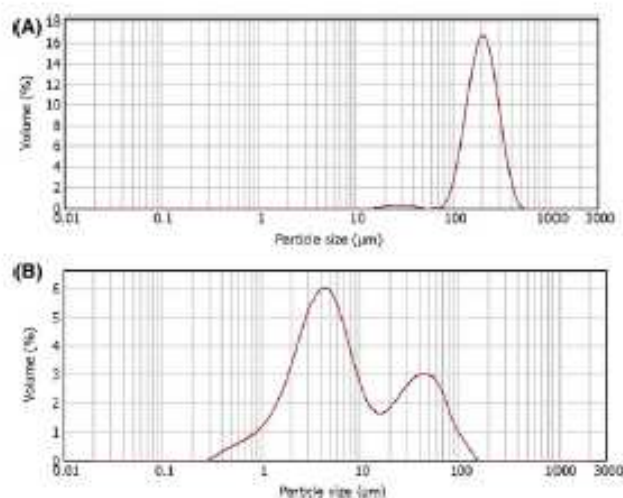
A sequential particle size distribution of the ECN ME is plotted in Figure 2A. A practically unimodal distribution can be observed with a maximum value at about 200  $\mu\text{m}$ . The minor peak between 10 and 40  $\mu\text{m}$ , representing qualitatively a residual content of the internal aqueous phase, falls far below D(v,0.1] and can be considered as non-relevant. Concerning the commercial formulation, D[v,0.9] value is about 53  $\mu\text{m}$ . Particle size distribution is plotted in Figure 2B. In this case, a clear bimodal distribution is observed with a minor peak at about 4.5  $\mu\text{m}$  and a major peak at 45  $\mu\text{m}$ .

#### 3.2 | Rheological measurements

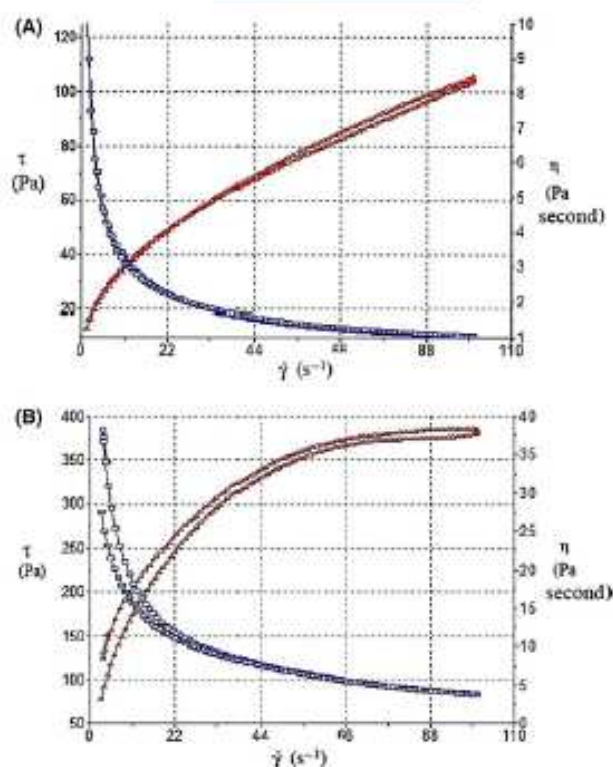
Steady-state rheological measurements as a function of shear rate are shown in Figure 3A,B. Formulations exhibited non-Newtonian pseudoplastic flow and shear-thinning behaviour with a consistent decrease in viscosity with increasing shear rate from 0 to 100/s.

**TABLE 4** Particle size parameters by LD of multiple emulsion and commercial formulation (mean, SD)

Parameter	Particle size analyses ( $\mu\text{m}$ )	
	Multiple emulsion	Commercial formulation
D[4.3]	215.3, 13.8	17.1, 7.9
D[3.2]	181.4, 19.3	3.8, 0.8
D[v,0.1]	128.5, 5.9	1.7, 0.3
D[v,0.5]	205.5, 10.9	6.4, 2.0
D[v,0.9]	319.3, 24.0	53.4, 22.0



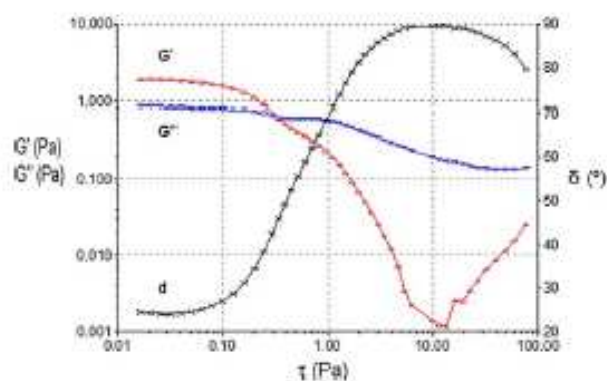
**FIGURE 2** A, Particle size distribution for econazole ME as volume percentages. B, Particle size distribution for econazole commercial formulation as volume percentages



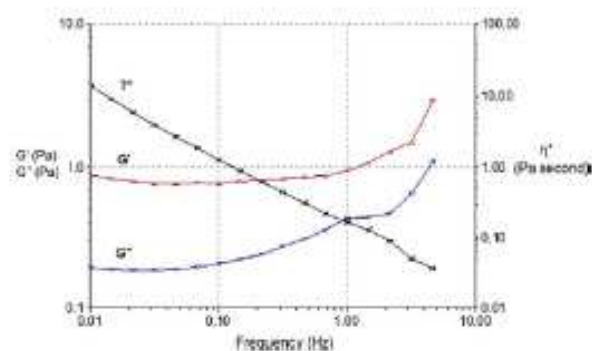
**FIGURE 3** A, Viscosity curves (blue squares) and flow curves (red triangles) of econazole ME after 24 h of preparation as a function of shear rate. B, Viscosity curves (blue squares) and flow curves (red triangles) of econazole commercial formulation as a function of shear rate

Viscosity of commercial formulation was markedly higher than ME. Cross-mathematical model showed the best statistical fitting of rheological behaviour in both ascending and descending stretches. Viscosity values (at 10 and 100/s) were 3405, 9.3 and 1047, 4.2 mPa/s for ECN ME and 19665, 191.2 and 3807, 10.3 mPa/s (mean, SD) for commercial formulation respectively. The flow curves indicated certain thixotropy as the rheograms displayed a slight hysteresis loop with the downward curve below the upward curve. Based on this hysteresis area, a pseudoplastic indicator, econazole ME displayed a thixotropy of 115.6 Pa/s and the commercial formulation value of 2649 Pa/s.

Oscillatory measurements of ECN ME to find the critical stress are plotted in Figure 4. During each sweep stress test, the changes in storage and loss modulus and the phase angle ( $G'$ ,  $G''$  and  $\delta$ ) were plotted as a function of shear stress at a frequency of 1 Hz. The end point of the linear viscoelastic region (LVR) was determined as a critical stress when the storage modulus ( $G'$ ) value was dropped 10% from the linear phase: approximately 0.1 Pa. According to those results, a constant shear stress of 0.05 Pa (50% of the critical value) was selected to perform the frequency sweep tests (Figure 5). Results for both ME formulations revealed, in this frequency range, a prevalence of the elastic over the viscous behaviour ( $G' > G''$ ), known as the 'elastic plateau'.



**FIGURE 4** Storage modulus ( $G'$ , triangle up), loss modulus ( $G''$ , triangle down) and phase angle ( $\delta$ , black stars) of econazole ME during a sweep stress test at a frequency of 1 Hz after 24 h of preparation



**FIGURE 5** Storage modulus ( $G'$ , triangle up), loss modulus ( $G''$ , triangle down) and complex viscosity ( $\eta^*$ , black stars) versus frequency during a frequency sweep test at a constant shear rate (0.05 Pa) for econazole ME after 24 h of preparation

### 3.3 | Stability

Multiple emulsions appeared as yellowish, odourless and homogenous without any signs of precipitation of drug, phase separation, creaming or any visual change of appearance in any of the samples kept at 5 and 30°C. At 40°C, ECN ME became unstable after 15 days storage. Samples of the isolated internal phase (Intermediate W/O emulsions) appeared as consistent, yellowish, odourless and homogenous. Initial pH values of the outer aqueous phase resulted to be 6.89, 0.20 room temperature, pH values of ME samples at the end of the study ranged between 6.16, 0.05 and 6.50, 0.07 (mean, SD).

Backscattered light measurements (Turbiscan® Lab Expert) were used to predict some instability phenomena. No relevant variations of the droplet volume fraction (migration) or mean size (coalescence) were observed on the unloaded ME and the ECN ME.

### 3.4 | Drug assay

Drug content on each formulation was analysed after 30 days of preparation as described before. Selected ECN ME formulation



contained 85.3% of the theoretical content of drug in the organic phase. Conversely, ECN commercial formulation contained 96.0% of the total nominal content of ECN.

### 3.5 | Antimicrobial challenge

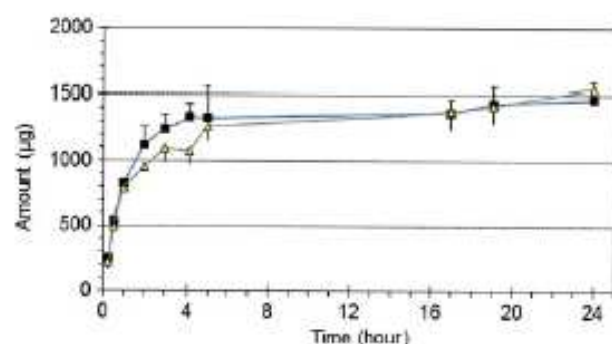
MIC results are reported in Table 5. Placebo formulations did not give any inhibitory activity against yeast growth. The MIC values of ECN ME show an antimicrobial activity similar to ECN commercial formulation product but lower than the reference solution in DMSO.

### 3.6 | Drug release

Figure 6 depicts ECN release profiles through nylon membranes ( $n = 3$ ) for both drug-containing formulations. Based on the minimum AIC value, drug release from the ME was best described with a first-order equation. Conversely, release from the commercial formulation was best described with an hyperbolic function. According with each equation, release rates are 0.88 per h, 0.4 per h (mean, SD) for the multiple emulsion and 1.02, 0.26 h for the commercial formulation.

**TABLE 5** Minimum inhibitory concentration (MIC) values of ECN solution, ECN multiple emulsion and ECN commercial formulation

Formulation	<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	<i>Candida glabrata</i> ATCC 66032	<i>Candida parapsilosis</i> ATCC 22019
ECN solution	0.3 µg/mL	78 µg/mL	5 µg/mL
ECN multiple emulsion	2 µg/mL	78 µg/mL	39 µg/mL
ECN commercial	2 µg/mL	78 µg/mL	39 µg/mL



**FIGURE 6** Release profiles (mean values and standard deviations) of econazole ME (filled squares) and commercial formulation (voided triangles)

**TABLE 6** Skin permeation parameters for both ECN multiple emulsion and ECN commercial formulation (mean, SD)

Formulation	24-h permeated amount (µg/cm <sup>2</sup> )	Degree of permeation (%)	Skin retention (%)	Permeation flux (µg/cm <sup>2</sup> ·h)
ECN multiple emulsion	11.64, 2.53	0.45	0.007, 0.002	0.696
ECN commercial	1.88, 0.74	0.06	0.004, 0.002	0.243

Concerning amodelytic parameters, released amounts at 24 h resulted to be 69% and 64%, for ME and commercial formulation respectively. Resulting AUC<sub>0-24</sub> values were 5231.49 (SD 627.65) µg/h and 4574.45 (SD 686.85) µg/h for ECN ME and the ECN commercial formulation.

No statistical differences due to formulations were demonstrated with an ANOVA test.

### 3.7 | Skin permeation

Resulting skin permeation parameters ( $n = 3$ ) are summarised in Table 6. Percentages of permeation are calculated accounting for the experimental drug content of each formulation per surface area. Permeation flux values (µg/cm<sup>2</sup>·h) for ME resulted to be statistically higher than those of the commercial cream ( $\alpha = 0.05$ ).

Conversely, skin retention ranged from 40 to 70 ppm, which is equivalent to 15.89 and 15.91 µg/cm<sup>2</sup> respectively. In this case, no significant differences ( $\alpha = 0.05$ ) between both formulations could be demonstrated.

## 4 | DISCUSSION

The low hydrosolubility of azolic antifungals make their topical delivery a considerable challenge. Their high lipophilicity implies that part of the drug must remain in suspension.<sup>55</sup> This fact limits its permeation rate and, thus, its accumulation in the desired site of action. In this study, multiple emulsions have been investigated as a possible alternative to improve the biopharmaceutical properties of econazole nitrate provided by a commercial anhydrous cream consisting of a dispersion of liquid paraffin aided with different macrogol fatty esters (surfactants and co-emulsifiers).

Multiple emulsions are a versatile carrier to vehiculise, for example, hydrophilic drugs with unstability limitations if administered orally. In this study, ME formulation of ECN has been optimised dissolving the total drug dose in the lipophilic phase of this hydrophilic formulation. It has been intended to achieve a higher skin permeation level and a similar skin retention than the commercial formulation with, at the same time, a favourable rheological performance.

Concerning the formulation characteristic of the ME, pH values of both aqueous phases can influence the release profile of ionisable drugs. In our case, the econazole isoelectric point (pH 6.6) has been selected for both aqueous phases to optimise its delivery and polarity, as suggested by other authors.<sup>6,22</sup>

The nitrate salt is preferable to the base for its higher water solubility. In fact, econazole base is practically insoluble in water, although

very soluble in ethanol. Conversely, the cationic form, ECN, is very slightly soluble in water and slightly soluble in ethanol<sup>18,19</sup> and has been completely dissolved in the lipophilic intermediate phase facing the internal and external aqueous phases. This oily phase represents only the 15.5% of the total weight and its composition was optimised in previous studies<sup>24</sup> concerning the formation of W/O primary emulsions and the achievement of an acceptable drug solubilising capacity. Classical oils (e.g. paraffin oil, castor oil, sweet almond oil, wheat germ oil...) were tested and discarded due to their poor stability and drug solubilisation capacity.<sup>24</sup> Alternatively, Labraphac<sup>®</sup> Lipophile WL 1349 (medium chain triglyceride) is devoid of mono- and diglycerides and free fatty acids with constant interfacial properties. It has been used by other authors<sup>25</sup> in similar concentration levels. In addition with Transcutol P<sup>®</sup> (diethylene glycol monoethyl ether), both are good solvents for lipophilic active pharmaceutical ingredients associated with enhanced drug penetration.<sup>26</sup> Based on their characteristics, this multiple emulsion is classified<sup>27</sup> as type C. Resulting drug inclusion levels (ca. 85%) and droplet sizes are comparable to those obtained by other authors with similar formulation strategies such as ECN ethosomes dispersed in enhancer-containing gels.<sup>4,5</sup>

Concerning long-term stability of ME, organoleptic characteristics and pH values remained almost constant over time, suggesting a good maintenance of their visual properties. Optical microscopic measurements revealed the presence of many small droplets inside the internal phase confirming the multiple structure. Eventual changes in droplet size distribution during stability were investigated with particle size laser analysis.<sup>28</sup> Measurements at initial time and at the end of stability storage are considered acceptable because the weighted residual correlation between calculated and measured data was in all cases lower than 1%. Higher values would indicate an incorrect use of refractive index and absorption values for the sample and dispersant.<sup>29</sup> It is known that this laser technique detects the size distribution of external droplets but not the size distribution of the internally embedded droplets. As a result, the dispersed volume fraction is estimated as a simple biphasic emulsion.<sup>40</sup> Considering that ECN is dissolved in the oily phase, that is, the continuous phase of the droplet, this simplification is reliably accepted as stability-indicating.

Considering  $D[v,0.9]$ , the 90% of the W/O droplets in ME fall below 319  $\mu\text{m}$  and about 53  $\mu\text{m}$  for the commercial formulation. It is noteworthy to comment that size distribution of the commercial formulation is clearly bimodal. As is shown in Figure 2B, the peak of larger particle size can be attributed to the droplet size of emulsion and the smaller size can be due to drug crystals in suspension as confirmed with polarised-light microscopical observations. No significant variations of droplet size parameters have been detected ( $\alpha = 0.05$ ). Stability is acceptable because variations in the volume-weighted mean diameter  $D[4,3]$  would be related with structure in the creams such as space fill and the volume-surface mean  $D[3,2]$  is important for issues related with the interfacial area, and, thus, transport.<sup>41</sup>

Optical measurements with Turbiscan<sup>®</sup> detect destabilisation phenomena related with phase separations, the last step of emulsion breaking: variations of the droplet volume fraction or particle migration (creaming, sedimentation) which are reversible by mechanical

agitation, and mean droplet size variations (coalescence, flocculation), oftenly irreversible.<sup>42</sup> Due to the opacity of the samples, only BS was measured, an useful approach for opaque and concentrated systems.<sup>43</sup> Resulting BS deviations were lower than 10% for the entire height of the measurement tubes and close to the baseline values at all times during the 24-h study. It means no significantly particle size variation phenomena under the analysis conditions at both times of measurement (initial and after 6 months). Based on this early instrumental detection of small changes in BS profiles before the appearance of a macroscopic scale physical modification, it can be assured<sup>44</sup> that the stability of the ME is larger than the duration of the study.

The influence of rheological characteristics over resulting permeation, skin application properties<sup>45,46</sup> and also as an indicator of stability<sup>5</sup> has been studied. Some authors<sup>47</sup> have found a reciprocal relationship between viscosity and drug release due to a reduction of diffusion rate.<sup>48</sup> In this sense, rotational viscosity test, oscillation stress sweep test and frequency sweep test have been run. As is shown in Figure 3A,B, it can be assumed that the steady shear viscosity sharply decreases with an increase in shear rate from 0 to 100/s. It demonstrates a marked non-Newtonian pseudoplastic shear-thinning flow behaviour with slight thixotropy, desirable properties for a topical semisolid preparation, since it should thin during application.<sup>49</sup> In case of ME, the shear induces irreversible structural changes which could be explained as a breakup of the multiple droplets without inversion producing a decrease in volume fraction and also in the viscosity.<sup>50</sup> This break up effect implies a reduction in the droplet size profile facilitating drug permeation. In fact, it is also known<sup>5</sup> an inverse relationship between particle size and occlusivity, explained as a covering effect which consequently facilitates permeation of drug.

Concerning the commercial formulation (Figure 3B), its higher viscosity decreases also rapidly with shear rate showing a higher thixotropic effect than ME without apparent droplet breakage. The oscillatory sweep stress and frequency sweep tests were used to evaluate the linear viscoelastic region, the complex viscosity ( $\eta^*$ ) and the storage modulus ( $G'$ ) and loss modulus ( $G''$ ) which provide a quantitative characterisation of the balance between the viscous and the elastic properties of the MEs.  $G'$  reveals the ability of the system to store recoverable elastic energy. Otherwise,  $G''$  measures the dynamic viscous behaviour related with the dissipation of energy associated with unrecoverable viscosity loss. As shown in Figures 4 and 5, all formulations revealed a prevalence of the elastic over the viscous behaviour ( $G' > G''$ ). This large elastic plateau supports the physical stability of the system and its resistance to external forces for long periods of time<sup>51</sup> favouring the extensibility on the skin surface.

Despite those behaviour, differences with respect to the shear rate, Cross equation<sup>52</sup> has resulted the best viscosity descriptor for both formulations, suggesting similar pseudoplastic flux under shear whatever the type of the formulation. Other models as Bingham, Ostwald de Waele, Herschel-Bulkley and Casson have been shown as less descriptive than Cross model equation.

It is commonly established that the penetration of topically applied drugs is clearly related with the type of vehicle.<sup>53,54</sup> When such a lipophilic drug is applied on the skin, it is accumulated in the outermost

layer, the SCR, which can release the drug slowly to the underlying skin layers depending on the interindividual skin variability. A W/O formulation for a lipophilic drug causes a typical occlusivity on the skin surface, which is a suitable environment for the fungal growth at body temperature. Conversely, the more hydrophilic and less occlusive W/O/W formulation entails a better physical protection against the growth of fungi with a pleasant and refreshing application comparable to those obtained with simple O/W emulsions. In fact, multiple emulsions provide a high spreadability as the result of their pseudoplastic flow and its final consistency can be modulated with the addition of viscosifying excipients, such as carbomer, in the external aqueous phase. This cross-linked polymer favours the shear thinning during the application and stabilises the interface with the internal W/O viscous formulation improving their long-term stability. In addition with this viscosity effect, the residence of the formulation in the skin or mucosa can be enhanced due to its mucoadhesive properties<sup>25,26</sup> and also to the favourable thixotropy of the formulation, enhancing drug delivery.<sup>27</sup>

The EUCAST test of antifungal activity is based on the calculation of the lowest ECN concentration that inhibits fungal growth (MIC) of each species. This BMD test is an easily performed, rapid, economical and widely used method intended for testing the susceptibility of glucose-fermentative yeast that cause clinically significant infections (primarily *Candida* spp.).<sup>28</sup> Results are different for each microorganism, being more effective against *Candida albicans* (2 µg/mL) than for the others.

Certain influence of the opalescence of the formulations has been observed, especially in case of *Candida albicans* and *Candida parapsilosis*. The drug solution in DMSO appears to be more effective than the formulations. No differences have been observed for *Candida glabrata*, with the higher value of MIC (78 µg/mL) in all cases. Equivalent results against *C. glabrata* (solution and creams) can be probably due to its comparatively lower sensitivity to econazole in comparison with *C. albicans* and *C. parapsilosis*. It also happens with other imidazolic antifungals such as isoconazole, where *C. glabrata* exhibits also the highest MIC value of the group.<sup>28</sup> Thus, at higher concentrations, the effect of opalescence of the sample would not be relevant.

Otherwise, both formulations have resulted equally effective against all strains, probably due to their rapid release profile of massive amounts of drug. In the following paragraph, those results are related with the ECN levels in skin.

Concerning the experimental conditions of release and permeation experiments, sink conditions are guaranteed in the receptor compartments of both experiments. Release membrane was selected based on ECN permeability. As a result, the most lipophilic material (nylon) resulted to be the most suitable. Membrane mesh size was clearly lower than droplet sizes. So, it can be assured that the observed profiles are properly due to the fraction of drug released from droplets. Spectrophotometric and chromatographic quantifications of ECN were previously validated with acceptable linearity, precision, accuracy and recovery.

Release profiles reached asymptotic values after 5 h in both formulations (69% and 64% of real drug content of ME and cream).

Individual profiles from ME were best described with a first-order equation, suggesting the passive diffusion from a drug-dissolved formulation. In case of the commercial formulation, which probably contains part of the dose in suspension, the best fitting was hyperbolic, a slightly slower process than the first-order equation. In both cases, the square-root equation, commonly used to describe release profiles from drugs over saturation, gave a poorer fitting based on the AIC value. An oversaturation of the drug in the formulations can be discarded. Those differences between both formulations prevented a modelistic comparison to be done. Instead of, permeation rates and extents were compared in terms of last-time released amounts (Q24) and AUC<sub>0</sub><sup>24</sup>. In general terms, although asymptotic levels are reached at the same time (5 h), drug is released more rapidly from the ME than from the commercial formulation. Nevertheless, no relevant statistical differences were observed between both formulations and were considered to be similar. Summarising, apart from the intrinsic differences of droplet size distribution and rheology, both formulations can be considered comparable in terms of in vitro drug release and antimicrobial efficacy.

Relating skin permeation, skin samples were dermatomed as whole epidermic arriving up to the deepest epidermic target site (400 µm). Drug retention in skin ranged between 40 and 70 ppm, which are equivalent to 15.89 and 15.91 µg/cm<sup>2</sup> for commercial formulation and ME respectively. Results were statistically similar for both formulations ( $\alpha = 0.05$ ). These drug concentrations fall in the range of the obtained in vitro MIC values, for example, 2 ppm for *Candida albicans* and 78 ppm for *Candida glabrata*. This fact supports the in vitro efficacy of ECN from both formulations. Other authors obtained comparable values with ECN polymeric micelles through ear pig skin such as 22.8 µg/cm<sup>2</sup> that penetrated via the hair follicles<sup>29</sup> and higher values with rat whole skin, 42.8 µg/cm<sup>2</sup>,<sup>20</sup> which is more permeable than human skin.

Accumulation of imidazolic antifungals in SCR seems to be due to a reversible drug binding to keratin,<sup>40</sup> that is directly proportional to drug lipophilicity and to the water content in skin.<sup>20</sup> It is known that skin retention occurs not only in SCR but also in epidermic and dermic tissues due to different factors.<sup>41</sup>

The ME formulation supplied an ECN permeation statistically higher than the commercial formulation (11.64 vs 1.88 µg/cm<sup>2</sup> at 24 h) based on ANOVA test. Drug flux from the ME (0.696 µg/cm<sup>2</sup>/h) resulted to be ×3 higher than the values obtained for the commercial formulation (0.243 µg/cm<sup>2</sup>/h), but no statistical differences were demonstrated. Other authors<sup>20</sup> have found higher ECN permeation levels with rat skin using a microemulsion, for example, 20.71 µg/cm<sup>2</sup> at 12 h and similar flux values, for example, 0.46 µg/cm<sup>2</sup>/h. In our case, this higher skin permeation for the ME can be attributed to the presence of solubilising excipients in the intermediate phase, able to dissolve the drug in, shortly, a 15% of the total formulation weight. Based on those results, it is shown that the presence of Labraphac<sup>®</sup> Lipophile WL 1349 and Transcutol P<sup>®</sup> confers both solubilising capacity and permeation enhancing activity to ECN in order to maximise its drug permeation through deep dermis in comparison with the commercial formulation.

In case of highly lipophilic drugs, their apparent accumulation in the SCR suggests that the hydrophilic skin region presents the main

barrier to permeation.<sup>62</sup> In fact, when applied topically, skin concentrations of imidazole drugs are relatively long-lasting, remaining for up to some days after the last application.<sup>68</sup> This is clinically relevant for cases where a long-lasting therapeutic effect beyond the application time is required; for example, to prevent re-infection.<sup>68</sup> Although, given that in vitro permeation from the multiple emulsion results to be clearly higher, similar results are expectable also in vivo, with a higher penetration rate of drug into the skin. An enhanced drug permeation during 24 h from the SCR into the viable epidermis allows to postulate a single administration per day instead of the current posology of each 12 h. Reducing the number of applications favours a better patient compliance.

In addition, the residence of the formulation on the skin or the mucosa can be enhanced by the adhesivity of carbomer and also the rheological characteristics of the multiple emulsion, facilitating its application in large body areas in contrast with classical formulations.

Considering that *Candida* spp. infectious manifestations range from superficial skin or mucosal infections to invasive and disseminated infections in severely compromised patients,<sup>2</sup> the higher human skin permeation flux obtained with the ME suggests also higher drug levels at the dermic site of action allowing an enhanced econazole delivery in the biophase if applied locally.

In summary, the rheological behaviour of this multiple emulsion allows an enhanced alternative for local application on skin or mucosal fungal infections. A lower viscosity and an acceptable thixotropy for this aqueous emulsion favour its extensibility. In addition, the presence of carbomer can enhance its adhesion if applied on mucosal tissues.

Anticandidiasis treatment with ECN requires a deep penetration to reach the local biophase. Resulting low-drug levels in skin are in accordance with the results of other authors and also with the range of required in vitro inhibitory concentrations of this antifungal against different species of *Candida*. This W/O/W multiple emulsion provides an enhanced delivery of econazole nitrate which might be an excellent alternative to some commercial creams for the treatment of cutaneous candidiasis.

## ACKNOWLEDGMENTS

Authors remember Prof. Dr. Coloma Barbé Rocabert at the Department of Pharmaceutics and Pharmaceutical Technology of the University of Barcelona, who died recently. She initiated the research line involving multiple emulsions at the Department and would have enjoyed reading this paper.

## CONFLICT OF INTEREST

Authors declare to have none conflict of interest.

## REFERENCES

1. Pal Kaur I, Kakkar S. Topical delivery of antifungal agents. *Expert Opin Drug Deliv*. 2010;7:1303–1327.
2. Quatresooz P, Piérard-Franchimont C, Arrese JE, Piérard GE. Clinical pathologic presentations of dermatomycoses in cancer patients. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2008;22:907–917.
3. Schaefer H, Stüttgen G. Absolute concentrations of an antimycotic agent, Econazole, in the human skin after local application. *Arzneim Forsch Drug Res*. 1976;26:432–435.
4. Verma P, Pathak K. Nanosized ethanolic vesicles loaded with econazole nitrate for the treatment of deep fungal infection through topical gel formulation. *Nanomedicine: Nanotechnol Biol Medicine*. 2012;8:489–496.
5. Keshri L, Pathak K. Development of thermodynamically stable nanostructured lipid carrier system using central composite design for zero order permeation of Econazole nitrate through epidermis. *Pharm Dev Technol*. 2013;18:634–644.
6. Nakhare S, Vyas SP. Prolonged release multiple emulsion based system bearing rifampicin: in vitro characterisation. *Drug Dev Ind Pharm*. 1995;21:869–878.
7. Seifriz W. Studies in emulsion III. Double reversal of oil emulsions occasioned by the same electrolyte. *J Phys Chem*. 1925;29:738–749.
8. Grossiord JL, Seiller M, eds. *Multiple Emulsion: Structure, Properties and Applications*. Paris: Editions de Santé; 1998:117–131.
9. Silva A, Grossiord JL, Puiseux F, Seiller M. Insulin in W/O/W multiple emulsions: preparation, characterization and determination of stability towards proteases in vitro. *J Microencap*. 1997;14:311–319.
10. Onuki Y, Morishita M, Takayama K. Formulation optimization of water-in-oil-water multiple emulsion for intestinal insulin delivery. *J Controlled Release*. 2004;97:91–99.
11. McClements DJ. Advances in fabrication of emulsions with enhanced functionality using structural design principles. *Curr Opin Colloid Interface Sci*. 2012;17:235–245.
12. Tang SY, Sivakumar M, Ng AMH, Shridharan P. Anti-inflammatory and analgesic activity of novel oral aspirin-loaded nanoemulsion and nano multiple emulsion formulations: generated using ultrasound cavitation. *Int J Pharm*. 2012;430:299–306.
13. Tomassi M, Dertzbaugh MT, Hearn T, Hunter RL, Elson CO. Strong mucosal adjuvancity of cholera toxin within lipid particles of a new multiple emulsion delivery system for oral immunization. *Eur J Immunol*. 1997;27:2720–2725.
14. Omotosho JA, Whateley AT, Florence AT, Bell G. Release of cytotoxic agents from multiple W/O/W Emulsions. *J Pharm Pharmacol*. 1987;39:38P.
15. Nakhare S, Vyas SP. Prolonged release of diclofenac sodium from multiple w/o/w emulsions systems. *Pharmazie*. 1994;49:842–845.
16. Vaziri A, Warburton B. Slow release of chloroquine phosphate from multiple taste-masked w/o/w multiple emulsions. *J Microencap*. 1994;11:641–648.
17. Ogata M, Matsumoto H, Hamada Y, et al. 1-[1-[2-[[3chlorobenzyl]oxy] phenyl] vinyl]-1H-imidazole hydrochloride, a new potent antifungal agent. *J Med Chem*. 1983;26:768–770.
18. Dyas AM, Delargy H. Econazole nitrate. In: Brittain HG, ed. *Analytical Profiles of Drug Substances and Excipients*, vol. 23. Milford: Elsevier Science; 1994:125–154.
19. Council of Europe. *European Pharmacopoeia 8.8 edition*. Strasbourg, 2016.
20. Ge S, Lin Y, Lu H, et al. Percutaneous delivery of econazole using microemulsion as vehicle: formulation, evaluation and vesicle-skin interaction. *Int J Pharm*. 2014;465:120–131.
21. Remington JP, Beringer P, eds. *Remington: The Science and Practice of Pharmacy*, 21st edn. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2006.
22. Heinrich Stahl P, Wermuth CG. *Handbook of Pharmaceutical Salts Properties, Selection, and Use*. Zurich: Wiley; 2008:342–350.
23. SmPC Ecotam®. Sesderma. Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios. Revised on 07/2013.
24. Suñer J, Calpena A, Aroztegui M, et al. *Preformulation of a multiple emulsion as a vehicle for clotrimazole delivery*. Lisbon: 9th World Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology, 2014.

25. Matsumoto S, Kita Y, Yonezawa D. An attempt at preparing water-in-oil-in water multiple-phase emulsions. *J Colloid Interface Sci.* 1976;57:353-361.
26. British Standards Institution. *Glossary of Terms Relating to Particle Technology (BS 2955:1993)*. London: BSI; 1993.
27. Park EK, Song KW. Rheological evaluation of petroleum jelly as a base material in ointment and cream formulations: steady shear flow behavior. *Arch Pharm Res.* 2010;33:141-150.
28. Rodríguez-Tudela JL, Arendrup MC, Barchiesi F, et al. 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.
29. Arendrup MC, Cuenca-Estrella M, Lass-Flo C. EUCAST technical note on the EUCAST definitive document EDef 7.2: method for the determination of broth dilution minimum inhibitory concentrations of antifungal agents for yeasts: EDef 7.2 (EUCAST-AFST). *Clin Microbiol Infect.* 2012;18:E246-E247.
30. Keshary PR, Huang YC, Chien YW. Mechanism of transdermal controlled nitroglycerin administration (III): control of skin permeation rate and optimization. *Drug Dev Ind Pharm.* 1985;11:1213-1253.
31. Costa P, Sousa Lobo JM. Modelling and comparison of dissolution profiles. *Eur J Pharm Sci.* 2001;13:123-133.
32. Yamaoka K, Nakagawa T, Uno T. Application of Akaike's information criterion (AIC) in the evaluation of linear pharmacokinetic equations. *J Pharmacokinet Biopharm.* 1978;6:165-175.
33. Raab WPE. *The Treatment of Mycosis with Imidazole Derivatives*. Berlin: Springer-Verlag; 1980.
34. Suñer J, Calpena AC, Clares B, Cañadas C, Halbaut L. Development of clotrimazole multiple W/O/W emulsions as vehicles for drug delivery: effects of additives on emulsion stability. *AAPS PharmSciTech.* 2016. doi:10.1208/s12249-016-0529-8.
35. Hameyer P, Jenni KR. Emulsifiers for multiple emulsions. *Cosm Toil.* 1996;11:39-48.
36. Gattefosse. Technical information. Consulted February 2016.
37. Florence AT, Whitehill D. Formulation and stability of multiple emulsions. *Int J Pharm.* 1982;11:277-308.
38. Ursica L, Tita D, Palici I, Tita B, Vlaia V. Particle size analysis of some water/oil/water multiple emulsions. *J Pharm Biomed Anal.* 2005;37:931-936.
39. Malvern Instruments Ltd. Mastersizer, User Manual. Worcestershire, UK, 2007.
40. Dickinson E, Evison E, Owusu RK. Preparation of fine protein-stabilized water-in-oil-in water emulsions. *Food Hydrocolloids.* 1991;5:481-485.
41. Marku D, Wahlgren M, Rayner M, Sjö M, Tingren A. Characterization of starch Pickering emulsions for potential applications in topical formulations. *Int J Pharm.* 2012;428:1-7.
42. Mengual O, Meunier G, Cayre I, Puech K, Snabre P. Characterisation of instability of concentrated dispersions by a new optical analyser: the TURBISCAN MA 1000. *Colloids Surf: Physicochem Eng Aspect.* 1999;152:111-123.
43. Lemarchand C, Couvreur P, Vauthier C, Constatini D, Gref R. Study of emulsion by graft copolymers using the optical analyzer Turbiscan. *Int J Pharm.* 2003;254:77-82.
44. Celia C, Trapasso E, Cosco D, Paolino D, Fresta M. Turbiscan<sup>®</sup> lab expert analysis of the stability of ethosomes and ultradeformable liposomes containing a bilayer fluidizing agent. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2009;72:155-160.
45. Vasiljevic D, Vuleta G, Primorac M. The characterization of the semi-solid W/O/W emulsions with low concentrations of the primary polymeric emulsifier. *Int J Cosmet Sci.* 2005;27:81-87.
46. Krishnaiah YS, Xu X, Rahman Z, et al. Development of performance matrix for generic product equivalence of acyclovir topical creams. *Int J Pharm.* 2014;475:110-122.
47. El-Badry M, Fetih G, Shakeel F. Comparative topical delivery of antifungal drug croconazole using liposome and micro-emulsion-based gel formulations. *Drug Deliv.* 2014;21:34-43.
48. Pal R. Effect of droplet size on the rheology of emulsions. *AIChE J.* 1996;42:3181-3190.
49. Pena LE, Lee BI, Sternes JF. Structural rheology of model ointment. *Pharm Res.* 1994;11:875-881.
50. Kawashima Y, Hino T, Takeuchi H, et al. Rheological study of w/o/w emulsions by a cone-and-plate viscometer: negative thixotropy and shear-induced phase inversion. *Int J Pharm.* 1991;72:65-77.
51. Korhonen M, Niskanen H, Kiesvaara J, Yliniemi J. Determination of optimal combination of surfactants in creams using rheology measurements. *Int J Pharm.* 2000;197:143-151.
52. Cross MM. Rheology of non-Newtonian fluids - a new flow equation for pseudoplastic systems. *J Colloid Sci.* 1965;20:417-437.
53. Daniels R, Knie U. Galenics of dermal products. Vehicles, properties and drug release. *J Dtsch Dermatol Ges.* 2007;5:367-383.
54. Nielsen PG. Die Bedeutung des Vehikels in der Behandlung der Dermatophyten-Infektionen der hereditären palmo-plantaren Keratodermien. *Mycoses.* 1984;27:227-230.
55. The Lubrizol Corporation. *Bioadhesion*. Technical Bulletin 23, 2011.
56. Johal HS, Garg T, Rath G, Goyal AK. Advanced topical drug delivery system for the management of vaginal candidiasis. *Drug Deliv.* 2016;23:550-563.
57. Silva AC, Amaral MH, González-Mira E, Santos D, Ferreira D. Solid lipid nanoparticles (SLN) - based hydrogels as potential carriers for oral transmucosal delivery of Risperidone: preparation and characterization studies. *Colloids Surf, B.* 2012;93:241-248.
58. Veraldi S. Isoconazole nitrate: a unique broad-spectrum antimicrobial azole effective in the treatment of dermatomycoses, both as monotherapy and in combination with corticosteroids. *Mycoses.* 2013;56(Suppl 1):3-15.
59. Bachhav YG, Mondon K, Kalia YN, Gurny R, Möller M. Novel micelle formulations to increase cutaneous bioavailability of azole antifungals. *J Controlled Release.* 2011;153:126-132.
60. Hashiguchi T, Kodama A, Ryu A, Otogiri M. Retention capacity of topical imidazole antifungal agents in the skin. *Int J Pharm.* 1998;161:195-204.
61. Tauber U, Rzedkiewicz M. Bioavailability of isoconazole in the skin. *Mykosen.* 1979;22:201-216.
62. Baker EJ, Hadgraft J. In vitro percutaneous absorption of arildone, a highly lipophilic drug, and the apparent no-effect of the penetration enhancer Azone in excised human skin. *Pharm Res.* 1995;12:993-997.
63. Lademann J, Patzelt A, Schanzer S, et al. Non-invasive analysis of penetration and storage of isoconazole nitrate in the stratum corneum and the hair follicles. *Eur J Pharm Biopharm.* 2012;80:615-620.

“A NOVEL BIFONAZOLE MULTIPLE EMULSION FOR EPIDERMAL DELIVERY: INFLUENCE OF POLYSORBATE 80 UPON SKIN PENETRATION”.

---

“Una nova emulsió múltiple de Bifonazol per a l’alliberament epidèrmic: Influència de l’addició de polisorbat 80 sobre la penetració dèrmica”.

J. Suñer-Carbó, A. C. Calpena-Campmany, L. Halbaut-Bellowa, B. Clares-Naveros, J. Zamarbide-Losada, E. Barbolini, A. Boix-Montañés

Sotmès

**ARTICLE III**

### Article III:

## “A NOVEL BIFONAZOLE MULTIPLE EMULSION FOR EPIDERMAL DELIVERY: INFLUENCE OF POLYSORBATE 80 UPON SKIN PENETRATION.”.

### Resum:

Les emulsions múltiples (ME) tenen un gran interès com a possibles vehicles per a l'administració de fàrmacs. S'han elaborat unes emulsions múltiples W/O/W com a sistemes hidrofílics d'administració tòpica per bifonazol (BFZ), un fàrmac antifúngic insoluble en aigua contra dermatòfits del teixit epidèrmic. La nova formulació al 1% de bifonazol s'ha preparat pel mètode d'emulsificació conegut com “en dues etapes”. S'ha utilitzat cetil dimeticona copoliol com a emulsionant lipòfil per l'emulsió primària. Per la segona emulsificació s'han utilitzat cocamidopropilbetaína (emulsionant hidròfil) i carbomer, i s'ha investigat la influència del Tween® 80, emulgent no iònic, sobre la penetració a la pell (JMLP01B, formulació sense Tween; JMLP01BT formulació amb Tween). La encapsulació del fàrmac ha estat aproximadament sobre el 85%. Les formulacions es caracteritzen i es comparen amb una formulació comercial (BFZ-CF). L'anàlisi reològica s'observa un comportament pseudoplàstic i un flux de tipus no-newtonià amb tixotropia simulant el model teòric de *Cross*. L'anàlisi reològica oscil·latòria s'han determinat per mesurar la regió viscoelàstica lineal, el mòdul d'emmagatzematge ( $G'$ ), mòdul de pèrdua ( $G''$ ) i la viscositat complexa ( $\eta^*$ ). L'emulsió múltiple de Bifonazol va mostrar una prevalença del comportament elàstic sobre el comportament viscos ( $G' > G''$ ). S'ha realitzat la estabilitat a sis mesos en funció de la mida de les gotes, l'anàlisi òptica i reològica. No es va observar agregació significativa o variacions de mida de gota.

En els perfils d'alliberament de fàrmac *in vitro* mostren en tots els casos, una cinètica d'arrel quadrada o *Higuchi* el que suggereix la difusió a partir d'una formulació de dosi infinita. Nivells asimptòtics de ca. contingut total de fàrmac 60% es va aconseguir en un màxim de set hores. La permeació en pell humana des de l'emulsió múltiple mostra valors de flux de principi actiu més baixos que la formulació comercial. Altrament, la penetració de la pell va resultar ser superior, especialment a partir de la formulació que conté polisorbato 80 (JMLP01BT), que ha incrementat (20 vegades) l'acumulació bifonazol dins de l'epidermis. Aquests resultats apunten a aquests sistemes com un enfocament òptim per concentrar el fàrmac en les capes epidèrmiques superficials per millorar la eficiència enfront els dermatòfits. Mesures addicionals, com ara la pèrdua transepidermica d'aigua (TEWL) confirmen l'absència de nivells significatius d'irritació després de l'aplicació.

TITLE PAGE

**Manuscript title**

A novel bifonazole multiple emulsion for epidermal delivery: Influence of polysorbate 80 upon skin penetration.

**Author names and affiliations**

J. Suñer-Carbó<sup>a</sup>, A. Calpena-Campany<sup>a</sup>, L. Halbaut-Belló<sup>a</sup>, B. Clares-Naveros<sup>b</sup>, J. Zamarbide-Losada<sup>a</sup>, E. Barbolini<sup>a</sup>, A. Boix-Montañés<sup>a</sup>

- a- Department of Pharmacy and Pharmaceutical Technology and Physical Chemistry. Faculty of Pharmacy and Food Sciences. University of Barcelona. Av. Joan XXIII s/n 08028. Barcelona, Spain.
- b- Department of Pharmacy and Pharmaceutical Technology. Faculty of Pharmacy. University of Granada. Campus de la Cartuja, s/n. 18071 Granada, Spain.



## **ABSTRACT**

Multiple emulsions W/O/W (ME) are investigated as hydrophilic topical delivery systems for bifonazole (BFZ), a water-insoluble drug against dermatomycoses caused by dermatophytes.

As a goal, an increase in the accumulation and residence of drug in skin has been searched for. The influence of polysorbate 80, a non-ionic-surfactant, on the properties of this novel developed 1% bifonazole ME was investigated concerning rheological properties and resultant skin penetration profile compared with a commercial O/W formulation.

Steady-state rheological assessment demonstrated non-Newtonian pseudoplastic shear thinning behaviour with thixotropy. Oscillatory stress sweep and frequency sweep revealed a prevalence of the elastic over the viscous behaviour.

No significant aggregation or droplet size variations were observed during a 6-month stability storage. In vitro BFZ release profiles followed, in all cases, a squareroot kinetic suggesting the diffusion from an infinite-dose formulation. Asymptotic levels of *ca.* 60 % total drug content were reached shortly. Human skin permeation revealed lower drug flux values and higher skin penetration than the commercial formulation, especially from the formulation containing polysorbate 80, that has increased (20-fold) the bifonazole accumulation inside the epidermis.

Those results point these ME's as an optimal approach to concentrate the drug in superficial epidermic layers to be active against dermatophytes.

### **Key terms:**

Multiple emulsion, bifonazole, polysorbate 80, pseudoplastic, drug release, skin penetration

## 1. Introduction

Bifonazole (1-[(1,1'-biphenyl)-4-phenylmethyl]-1H-imidazole) (BFZ), is an imidazole antifungal indicated for the treatment of superficial dermatomycoses (e.g. dermatophytes and *Malassezia sp.* causing different *Tineas*) whose pathogenicity is related with their ability to gain access to other target tissues (Quatresooz et al., 2008, SmPc Canesmycospor, 2015). In recent years, the application of imidazole derivatives is increasing, especially in patients with a compromised immunity. Superficial fungal infections are commonly encountered and the continuously changing epidemiology of invasive fungal infections results in the need for an expanded armamentarium of antifungal therapies (Abdul Bari, 2013). Since the side effects of topical antifungals are lesser than their oral counterparts, they are particularly preferred for dermatological infections (Gupta et al., 2003).

Several formulation approaches are possible for the topical administration of azolic antifungals, that require a definite drug retention in skin. Examples include micelles, lipidic systems such as solid lipid nanoparticles or nanostructured lipid carriers, microemulsions and vesicular systems such as liposomes, niosomes, transferosomes or ethosomes (Bseiso et al., 2015; Gungor et al., 2013). In this sense, multiple W/O/W emulsions are complex systems where two hydrophilic internal and external phases are separated by a lipophilic layer that dissolves hydrophobic drugs and vehiculize them with optimal thermodynamic activity.

Many authors have called them “emulsions of emulsions” since they are formed by phase inversion of a simple emulsion (Seifriz, 1925). They are generated from a dispersion, in an external continuous phase, of droplets containing smaller droplets of a phase similar to the external one. At least two surfactants are required for their formation: The one with low HLB forms the primary w/o emulsion while the one with the high HLB is used to achieve the secondary o/w emulsification. In this sense, polysorbates (o/w emulsifiers) and sorbitan esters (w/o emulsifiers) are non-ionic surfactants that enhance the formulation stability and flexibility and widen its compatibility. They are stable in acids, do not react with ionic ingredients or actives and have a safe history of use (Firooz et al., 2015). In addition, silicone-based polymeric emulsifiers provide a strong, thick and well-defined film around the W/O interface, facilitating also the formulation of ME's (Grossiord et al., 1998).

The aim of the present study was to evaluate the influence of polysorbate 80 (Tween<sup>®</sup> 80) included into the external gelified phase of a previously optimized multiple emulsion (Suñer et al., 2017b) to enhance the rheological characteristics and increase the skin retention of topically administered bifonazole. Emulsions were characterized with optical examination, droplet size distribution, rheological studies, pH and conductimetric analyses, and tested for stability purposes. *In vitro* release test and human skin permeation test were also investigated. Finally, some *in vivo* skin tolerability-indicating measurements were run after the application of BFZ-ME's and a commercial formulation (BFZ-CF) on human skin.

## 2. Material and methods

### 2.1 Substances and reagents

Bifonazole (BFZ), sodium chloride, cetyl palmitate (CP), and Polysorbate 80 (Tween<sup>®</sup> 80, HLB 15) were obtained from Acofarma (Barcelona, Spain). Sorbitan stearate (Span<sup>®</sup> 60, HLB 4.7) was obtained from Fagron (Terrassa, Spain). The lipophilic surfactant cetyl dimethicone copolyol (14,000 MW, HLB 5; Abil<sup>®</sup> EM90, CDC), the amphoteric surfactant cocamidopropyl betaine (Tego<sup>®</sup> Betain F, CMB), and the thickening acrylic agent polymer (Tego<sup>®</sup> Carbomer 341ER, TGC) were supplied by Evonik (Essen, Germany). Capric/caprylic triglyceride (Labrafac<sup>®</sup> Lipophile 1349, LP) and Trancutol P were supplied by Gattefossé (Saint-Priest, France). Deionized water used in all experiments was self-produced from a Milli-Q<sup>®</sup> system (Millipore Iberica S.A.U., Madrid, Spain). Methanol HPLC grade was obtained from Fisher Scientific (Madrid, Spain). Ammonium acetate, ethanol, sodium dodecyl sulphate, sodium hydroxide and potassium monohydrogen phosphate were obtained from Panreac (Barcelona, Spain). Hank's stock solution was obtained from ThermoFisher Scientific (Barcelona, Spain). Commercial formulation of 1 % Bifonazole (BFZ-CF) available was used as a comparable formulation.

## 2.2 Preparation of multiple emulsions

Previous studies lead us the development of a stable W/O/W multiple emulsion for imidazolic antifungals (Suñer et al., 2017b) by the two step emulsification method (Matsumoto et al., 1976). The most appropriate composition was selected (Table 1). First emulsification (W/O primary emulsion) used a set of lipophilic surfactants (cetyl dimethicone copolyol and sorbitan stearate) in combination with drug solvent and cosolvent (LP and CP) as the oil phase. The second emulsification required dispersing 50 % (w/w) of the primary emulsion (W/O) in the external aqueous phase containing the hydrophilic surfactant (cocamidopropyl betaine) and the gelling thickener (carbomer) to complete the W/O/W multiple emulsion. Two formulations were prepared to investigate the effect of polysorbate 80 as a co-emulsifier in the outer water phase. They are coded with the suffixes “-B0” (without Tween<sup>®</sup>) and “-BT” (with Tween<sup>®</sup>). Commercial formulation is named BFZ-CF.

### TABLE 1

Firstly, primary W/O emulsions were prepared by the slow addition of the aqueous phase containing the electrolyte (NaCl) to the oily phase containing BFZ (1 %, w/w) at  $80 \pm 2^\circ\text{C}$  under continuous stirring using a mechanical stirrer Schott RM 144 D (Schott Ibérica, Barcelona, Spain) at 500 rpm until cooling up to approximately  $25^\circ\text{C}$ . The oily phase was previously prepared by the addition of BFZ, the selected lipophilic emulsifying agents (CDC and sorbitan stearate) to LP and CP preheated at  $80 \pm 2^\circ\text{C}$ . In the second step, 50 % (w/w) of the obtained primary emulsion was slowly added to the water phase containing the secondary hydrophilic emulsifiers (CMB and/or without polysorbate 80) and TGC as a thickening agent, while the system was stirred at 250 rpm at room temperature. After complete inclusion of the primary emulsion, the stirring was continued for 10 min until complete formation of the W/O/W emulsions. External aqueous gelified phase was previously prepared by dissolving the cross-linked TGC polymer in a co-solvent system comprising deionized water, the hydrophilic emulsifying agents (CMB) in the case of JMLP01B0 and CMB and polysorbate 80 in the case of JMLP01BT. After 24 h, carbomer was completely wet out and it was neutralized with a 10% sodium hydroxide solution until a pH value of 6.5 to 7.0. Afterwards, gelified aqueous phase was ready to use in the second emulsification.

## 2.3 Organoleptic and microscopic analyses

Macroscopic organoleptic characteristics were monitored to detect any visible sign of instability such as creaming, phase separation or colour changes. Formulations were also investigated by microscopic analysis to evaluate their droplet homogeneity and size distribution using an optical Leica DM 1000 LED light microscope (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) at 400x magnifying power. Images were captured using an adapted camera Leica EC3 (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany). Measurements were taken directly and after carefully diluting samples (1:20) with water just ending formulation and monthly during a six-month stability storage.

#### 2.4 Conductivity and pH measurements

Conductivity ( $\mu\text{S}/\text{cm}$ ) of the W/O/W emulsions diluted 1:20 in deionized water was measured with a conductivity meter Crison GLP 30 (Crison Instruments, Alella, Spain). Measurements ( $n = 3$ ) were taken at 24 h and 180 days after preparation. pH was measured with a digital pH meter Crison micropH 2000 (Crison Instruments, Alella, Spain). Measurements were performed at 24 h and 180 days after elaboration by direct immersion at room temperature ( $n = 3$ ). Results were compared for statistical significance by Student's *t* test. Values are reported as mean  $\pm$  SD and the data were considered as statistically significant as  $p < 0.05$ .

#### 2.5 Droplet size measurements

Droplet size analysis was performed by laser diffractometry (LD) using a Malvern *Mastersizer 2000* (Malvern Instruments, Worcestershire, UK) and deionized water as dispersant. The relative distribution of droplets volume in size ranges was based on Mie theory. The droplet size in terms of volume distribution was reported as  $D[v,0.1]$ ,  $D[v,0.5]$ , and  $D[v,0.9]$ , standard percentile readings of the distribution. The volume-weighted mean diameter,  $D[4,3]$  and volume-surface mean diameter,  $D[3,2]$ , were also obtained (Malvern Instruments, User Manual 2007). They were measured ( $n=3$ , room temperature) at 24 h and 180 days after elaboration.

#### 2.6 Rheological analyses

Rheological analyses of multiple W/O/W emulsions at  $25 \pm 0.2^\circ\text{C}$  were carried out after 24 h preparation. Two kinds of measurements were made to characterize the samples: rotational measurements and oscillatory tests. Rheological measurements were performed with a Haake Rheostress 1<sup>®</sup> rheometer (Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe, Germany) connected to a thermostatic circulator Thermo Haake Phoenix II + Haake C25P. Data were analyzed with Haake Rheowin<sup>®</sup> Data Manager v. 3.3 software (Thermo Electron Corporation, Karlsruhe, Germany).

*2.6.1 Rotational measurements.* Steady-state measurements were addressed with cone and a mobile upper cone Haake C60/2° Ti (60 mm diameter, 2° angle). The shear stress ( $\tau$ ) was measured as a function of the shear rate ( $\dot{\gamma}$ ). Viscosity curves ( $\eta = f(\dot{\gamma})$ ) and flow curves ( $\tau = f(\dot{\gamma})$ ) were recorded at  $25 \pm 0.1^\circ\text{C}$ . The shear rate ramp program included 3 min ramp-up period from 0 to  $100 \text{ s}^{-1}$ , 1 min constant shear rate period at  $100 \text{ s}^{-1}$ , and finally 3 min ramp-down period from 100 to  $0 \text{ s}^{-1}$ . Data from the flow curves (when resulted to be non-Newtonian) were fitted using different mathematical models to identify the model that provided the best overall match of the experimentally observed

rheological data: Bingham, Ostwald de Waele, Herschel-Bulkley, Casson, and Cross (Park et al., 2010). The adequacy of the rheological profiles to the mathematical models was based on the correlation coefficient value ( $r$ ) and chi-square value. The determination of the disturbance of the microstructure during the test or apparent thixotropy (Pa/s) was evaluated by determination of the area of hysteresis loop. Steady-state viscosity ( $\eta$ , Pa s) was determined from the constant shear section at  $100 \text{ s}^{-1}$  and also from the ramp-up period at  $10 \text{ s}^{-1}$ . The rheological properties of the samples were observed 24 h after preparation and during storage conditions at room temperature.

**2.6.2 Dynamic oscillatory measurements.** Dynamic tests were also performed using the same apparatus described above but with parallel plate and plate geometry (Haake PP60 Ti, 60 mm diameter, 0.5 mm gap separation between plates). Firstly, oscillatory stress sweep test was performed at a constant frequency of 1 Hz. to an increasing shear stress from 0.01 to 100 Pa in order to determine the linear viscoelastic region (LVR) of the samples. The end of the linear viscoelastic region (LVR) was determined as the critical stress when the storage modulus ( $G'$ ) value dropped 10 % from the linear phase. Frequency sweep test was carried out, varying the frequency range between 0.01 and 10 Hz at a constant shear rate within the linear viscoelastic region (LVR), to determine the related variation of the storage modulus ( $G'$ ), loss modulus ( $G''$ ), phase angle ( $\delta$ ), and the complex viscosity ( $\eta^*$ ). During each sweep stress test, the changes in storage and loss modulus and the phase angle ( $G'$ ,  $G''$  and  $\delta$ ) were plotted as a function of shear stress at a frequency of 1 Hz.

## 2.7. Drug content

**2.7.1 Drug extraction.** A sample equivalent to about 5 mg BFZ was mixed with 5 mL of methanol and dispersed in an ultrasound bath for 10 min. Afterwards, sample was centrifuged at 3000 rpm/10 min and the resulting supernatant was transferred to a vial. After 1:100 dilutions with methanol/buffer phosphates (75:25), the resulting solution, with a theoretical concentration of  $10 \mu\text{g/mL}$ , was filtered through  $0.45 \mu\text{m}$  nylon disposable filter and measured spectrophotometrically for bifonazole content (Popović et al., 2003).

**2.7.2 UV analysis.** BFZ concentration in drug release samples and assay formulations were measured by UV-spectrophotometry at  $\lambda = 254 \text{ nm}$  (Thermo Spectronic Helios Beta, Thermo, Cambridge, UK). Validation was run according to standard guidelines (EMA, 2011) including linearity, intraassay and interassay precision and accuracy. Calibration curves were prepared with Methanol/Buffer phosphate  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  75:25 (v/v). Linearity was demonstrated between 2.61 and  $10.00 \mu\text{g/mL}$ . Accuracy ranged from -3.12 to +2.58 %. Concerning precision, maximum RSD was +4.36 %. Recovery in formulation samples was tested in triplicate using a 1 % BFZ methanol solution (Meth-Sol) resulting to be 93.4 % (RSD 7.6 %) and considered satisfactory for our purposes.

**2.7.3 HPLC analysis.** BFZ concentration in skin permeation samples was quantified using a Waters Alliance 2695 HPLC (Waters, Milford, MA, USA) with a PDA detector Waters 2996 (Waters, Milford, MA, USA) and a C18 column Brisa LC2,  $5 \mu\text{m}$ ,  $4.6 \text{ mm} \times 250 \text{ mm}$  (Teknokroma, Barcelona, Spain). The mobile phase consisted of methanol-ammonium acetate 65mM (65:35, pH 3.6) (Cudina et al., 2005) at a flow rate of  $1 \text{ mL/min}$  at  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ . Detection was monitored at 220 nm and the injection volume was  $10 \mu\text{L}$ . Calibration curves were prepared from 1.56 to  $100.00 \mu\text{g/mL}$  with mobile phase.

Accuracy resulted to be lower than +3.7%. Concerning precision, maximum RSD was 0.8 %, with an acceptable linearity inside the calibration range.

2.7.4 Statistical analyses. Descriptive statistics, confidence interval and regression were calculated with the Graphpad® Prism software v.3 (Graphpad Software, San Diego, CA, USA).

## 2.8 Stability studies

2.8.1 Near-Infrared-Reflectance (NIR) prediction of long-term stability. The stability of the ME's was estimated by multiple light scattering using the *Turbiscan*® Lab Expert (Formulation, L'Union, France) to detect destabilization phenomena. Diluted samples (~35 mL) were placed into cylindrical glass measuring cells, and were completely scanned by a reading head that consists of a pulsed near-infrared light source ( $\lambda = 880$  nm) and two synchronous optical detectors. A pattern of the backscattered light as a function of the sample height was obtained giving a macroscopic fingerprint of the sample at a predetermined time. Measurements were performed 24 h after preparation and at 6 months storage at room temperature.

2.8.2 Long-Term Stability. Drug content and physicochemical properties of multiple W/O/W emulsions samples such as: droplet size distribution (D[4,3], D[3,2]), pH, conductivity and viscosity were analyzed at real time during a storage of 180 days at room temperature following the significance of its variations. Thermal stability was also tested at additional storage conditions for both primary W/O emulsions and multiple W/O/W emulsions. Test tubes were kept vertically and stored at  $5 \pm 3^\circ\text{C}$ ,  $30 \pm 2^\circ\text{C}$ ,  $40 \pm 2^\circ\text{C}$  in stability cabins (Heraeus B 5042 E and I 42, Madrid, Spain). Macroscopic analyses were performed by direct phase behaviour observation in the resultant multiple W/O/W emulsions evaluating potential appearance of creaming, phase separation, or colour changes. Observations were made each month for 180 days.

## 2.9 In vitro Drug release

In vitro release through 0.45 $\mu\text{m}$  nylon membrane (Teknokroma, Barcelona, Spain) was tested with vertical diffusion cells (Keshary et al., 1985) with a diffusion area of 2.54 cm<sup>2</sup> (Vidrafoc, Barcelona, Spain). Receptor solution was a well-stirred solution of 12 mL Methanol:K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> Buffer 0.05M 75:25 (v/v) at  $32 \pm 0.5^\circ\text{C}$  satisfying sink conditions for bifonazole. Comparative release profiles of each formulation were obtained (n=3) testing ca. 300 mg aliquots in the donor compartment. Samples of receptor compartment (300  $\mu\text{L}$ ) were taken with immediate replacement and spectrophotometric analysis at different scheduled times during a minimum of 5 h.

Drug release equations (Costa et al., 2001) reported in Equations 1 to 5 (zero order, first order, Hyperbola, Weibull and Higuchi) were fitted to the cumulative released BFZ amounts using a non-linear regression routine with Graphpad® Prism 3 software (Graphpad Software, San Diego, CA, USA).

$$\text{Zero order: } Q_t = K \cdot t \quad (\text{Equation 1})$$

$$\text{First order } Q_t = 1 - e^{-k \cdot t} \quad (\text{Equation 2})$$

$$\text{Hyperbola} \quad Q_t = (Q_{\max} \cdot t)/(K+t) \quad (\text{Equation 3})$$

$$\text{Weibull} \quad Q_t = 1 - e^{-(t/t_d)^\beta} \quad (\text{Equation 4})$$

$$\text{Higuchi} \quad Q_t = K \cdot t^{1/2} \quad (\text{Equation 5})$$

Where  $Q_t$  is the amount of drug released at time  $t$ ,  $Q_{\max}$  is the maximum asymptotic value of ordinate,  $K$  are the corresponding release rate constants,  $t_d$  is the time to achieve 63.2% of the asymptotic release and  $\beta$  is the shape parameter.

The best model was selected based on the minimum value of Akaike Information Criteria (AIC) calculates as:

$$\text{AIC} = n \cdot \ln \text{SSQ} + 2p \quad (\text{Equation 6})$$

where  $n$  is the number of pairs of experimental values,  $\text{SSQ}$  is the residuals sum of squares and  $p$  is the number of parameters of the equation (Yamaoka et al., 1978).

Descriptive parameters were: release rate  $K$  (best function), released percentages at five hours ( $Q_{5\%}$ ) and efficiency, described as:

$$\text{AUC}_0^5 / (Q_{5\%} \cdot T) \quad (\text{Equation 7})$$

where  $\text{AUC}$  is the individual area under the curve of released amounts and  $T$  is the time for the first asymptotic value.

Comparisons were performed by one-way analysis of variance ANOVA using the GraphPad® Prism 3 software (Graphpad Software, Sant Diego, CA, USA).

## 2.10 Drug penetration – permeation

BFZ skin permeation was investigated with vertical diffusion cells (Keshary et al., 1985) with a  $0.64 \text{ cm}^2$  diffusion area (Vidrafoc, Barcelona, Spain). Experiments were done in triplicate. Permeation flux and skin retention levels were evaluated simultaneously for each replicate. Results were analysed grouping by formulation.

Skin was obtained from leftovers of abdominal plastic surgery (Hospital de Barcelona, SCIAS, Barcelona, Spain). Procedure of skin residues donation was approved by the Bioethics Committee of "Hospital de Barcelona" (Barcelona, Spain) and written informed consent forms were provided to skin donors. After surgical excision, skin was immediately debrided, transferred to the laboratory immersed in Hanks' solution and frozen at  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$  for storage.

Prior to the experiment, skin was partially defrosted and laminar samples ( $400 \text{ }\mu\text{m}$ ) were obtained with an electrical dermatome (Aesculap GA 630, Tuttlingen, Germany). Skin specimens were mounted on vertical diffusion cells and receptor compartment was filled up with a solution of Ethanol/Transcutol® P/Water (50:20:30 v/v/v) satisfying sink conditions for BFZ. After temperature equilibration at  $32 \text{ }^\circ\text{C}$ , skin integrity was verified by means of *in vitro* transepidermal water loss (TEWL) (Tewameter TM300, Köln,

by means of *in vitro* transepidermal water loss (TEWL) (*Tewameter* TM300, Köln, Germany). Acceptable values (human) ranged between *ca.* 4 to 8 g/h/m<sup>2</sup> (Oestmann et al., 1993)

Experiments were initiated applying *ca.* 300 mg formulation to the donor compartment. At predefined times, 300 µL sample were taken with replacement during a minimum of 32 h. Samples were kept into vials at -20 °C until HPLC analysis.

2.10.1 Drug permeation. Drug concentrations were quantitated as described in 2.7.3 and used to calculate the cumulative amounts of permeated BFZ per unit area (Qt). Permeation extent of BFZ was described with the permeated values at last experimental time (Q32). Permeation flux (J) was calculated by linear regression between Qt and time (t) in the linear phase.

2.10.2 Drug penetration. At the end of each experiment, the residual amounts of formulation in donor compartment were drained out and skin specimens were removed from the cell. Epidermal side was rinsed with aqueous 0.5 % sodium laurylsulphate and afterwards with deionized water. Resulting skin specimens were blotted dry, weighted and minced. Drug extraction was done adding 1 mL of fresh receptor solution to each minced skin sample. After 10 min of ultrasound dispersion, liquid was recovered iterating twice. Collected solutions were centrifuged (1500 rpm, 10 min) and immediately analyzed. Drug retention levels (mean, SD) were reported as the ratio between the amount of drug and the weight of skin sample (µg/g) and also as the amount of drug per surface unit (µg/cm<sup>2</sup>).

2.10.3 Statistical analyses. Statistical comparisons ( $\alpha=0.05$ ) were performed by one-way analysis of variance ANOVA using the GraphPad® Prism 3 software (Graphpad Software, Sant Diego, CA, USA).

## 2.11 Skin Integrity Assessment

Skin integrity of formulations was investigated with simple *in vivo* measurements of skin elasticity, stratum stratum hydration (SCH) and transepidermal water loss just before (placebo time) and after 1 h of application.

Experimental procedure was submitted for approval by the local ethics committee (Bioethics Commission, University of Barcelona) in accordance with The Code of Ethics of the World Medical Association (Declaration of Helsinki) for experiments involving humans. Predictable risks and burdens to the individuals were previously assessed giving an informed consent document to each individual. Ten healthy volunteers participated in the study ageing 20 to 52 years. The volunteers refrained from using body care cosmetics or moisturizers on their arms three days prior to the day of measurements. Known allergies to any type of soaps or tensioactives were considered a reason for exclusion.

2.11.1 Skin elasticity. The effect of the formulation on the elasticity of the upper skin layers was tested with a *Cutometer*® MPA 580 (Courage and Khazaka, Electronic GmbH, Köln, Germany). This non-invasive measurement generates a negative pressure, drawing the skin into a probe that leads to a vertical deformation. When the negative



pressure is switched off, the skin recovery is characterised (Neto et al., 2013) in terms of biomechanical properties of dermis. Results (mean) are given in arbitrary units (AU).

**2.11.2 Skin hydration.** Hydration of Stratum corneum (SCH) has been used to detect formulation-induced changes in the skin. This measurement was performed with a *Corneometer*<sup>®</sup> 825 (Courage and Khazaka, Electronic GmbH, Köln, Germany). Results (mean) are given in arbitrary units (AU).

**2.11.3 Transepidermal Water Loss (TEWL).** Retrograde water permeation was measured with a *Tewameter*<sup>®</sup> TM 300 (Courage and Khazaka, Electronic GmbH, Köln, Germany). It measures the vapour density gradient across the skin combining temperature and relative humidity sensors mounted inside a hollow cylinder that is applied on the skin surface. Results were expressed as  $\text{g}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$ .

**2.11.4 Measurements.** Ambiental conditions were  $22 \pm 30$  °C and 55 % relative humidity. Skin Temperature was measured with a Skin Thermometer<sup>®</sup> ST500 (Courage and Khazaka, Electronic GmbH, Köln, Germany). Initially, subjects rested for 20 minutes to acclimate. Then, a measurement of each parameter was taken in the skin area selected to apply each formulation ( $t_0$ ) in the volar forearm of the left arm of each volunteer. After 1h application of the formulations ( $t_1$ ), a second set of measurements was obtained. Results were expressed as individual differences of each parameter and formulation. Individual differences for each case were analysed with a one-way Anova and a Bonferroni post-test to impute the differences, using Prism<sup>®</sup> V. 5.00 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA).

### 3. Results

#### 3.1 Droplet size

The multicompartimental structure of ME was confirmed by optical microscopy. Multi-globules containing many small droplets in the internal phase are shown in Fig. 1a and 1b. The size of the internal droplets (primary W/O emulsion) was in the range of 1 to 5  $\mu\text{m}$ . The diameters of multi-globules ranged between 10-50  $\mu\text{m}$  and were later confirmed by laser diffractometry. Within experimental uncertainty, diameter ranges of each emulsion remained invariable over the whole storage period (six months) suggesting the absence of external and internal coalescence. Droplets of W/O BFZ-CF (Fig. 1c) ranged about 5  $\mu\text{m}$ , as the primary  $W_1/O$  emulsion of the ME's.

#### FIG 1

Concerning laser diffractometry, mean values of volume-weighted mean diameter ( $D[4,3]$ ), volume surface mean diameter ( $D[3,2]$ ) and  $D(v,0.1)$ ,  $D(v,0.5)$  and  $D(v,0.9)$ , with their respective standard deviations are summarized in Table 2. Fig. 2 shows the particle size distribution of JMLP01B0, JMLP01BT (after 24 h of preparation) and BFZ-CF.

#### TABLE 2, FIG 2

#### 3.2 Conductimetric and pH analyses

Conductivity (mean, SD) at 24 h and after six months were  $309.5 \pm 6.5$  and  $336.3 \pm 7.1$   $\mu\text{S}/\text{cm}$  for JMLP01B0 and  $257.3 \pm 3.2$  and  $289.0 \pm 3.5$   $\mu\text{S}/\text{cm}$  for JMLP01BT respectively.

Statistically significant differences ( $p < 0.05$ ) were found between the results of both ME's JMLP01B0 and JMLP01BT but not for the differences between 0 and 6 months. Both emulsions showed pH values between 5.8 and 6.1, without significant differences. Initial pH values of the outer aqueous gelified phase resulted to be  $6.89 \pm 0.2$  at room temperature. pH values of ME samples at the end of the study ranged between  $6.16 \pm 0.5$  and  $6.50 \pm 0.7$  (mean, SD).

### 3.3 Rheological behaviour

**3.3.1. Rotational test.** Steady-state rheological measurements as a function of shear rate are shown in Fig. 3-4 and Table 3. Viscosity of BFZ-CF (at 10 and  $100 \text{ s}^{-1}$ ) was markedly higher than ME's. Formulations exhibited non-Newtonian pseudoplastic flow and shear thinning behaviour with a consistent decrease in viscosity with increasing shear rate from 0 to  $100 \text{ s}^{-1}$ . Cross model showed the best fitting to both ascending and descending stretches. The flow curves (Fig. 3) indicated certain thixotropy as the rheograms displayed a moderate hysteresis loop with the downward curve below the upward curve ( $553.8 \text{ Pa/s}$  for JMLP01B0 and  $787.5 \text{ Pa/s}$  for JMLP01BT).

**TABLE 3. FIG. 3-4**

**3.3.2. Oscillatory test.** Oscillatory measurements were performed in order to find the critical stress (Fig. 5 and Table 4). As shown in Fig. 4, the critical stress was found at stresses below approximately 2 Pa. According to those results, a constant shear stress of 1 Pa (50 % of the critical value) was selected to perform the frequency sweep tests (Fig. 4). Results for both ME formulations revealed, in this frequency range, a prevalence of the elastic over the viscous behaviour ( $G' > G''$ ), known as the "elastic plateau" as shown in Table 4. Additionally, the results showed a higher viscosity for JMLP01BT multiple emulsion, confirming rotational results.

**TABLE 4. FIG. 5**

### 3.4 Drug content

Drug content on each formulation was analysed after 30 days of preparation as described in 2.7. Formulations JMLP01B0 and JMLP01BT contained  $90.6 \pm 1.8 \%$  and  $95.8 \pm 2.2 \%$  respectively of the theoretical content of drug in the organic phase. BFZ-CF contained  $94.1 \pm 1.7 \%$  of the declared content of BFZ (mean, SD).

### 3.5 Stability studies

The recently prepared simple  $W_1/O$  emulsions appeared as white, odourless, greasy, homogeneous and had a high consistency.  $W_1/O/W_2$  appeared as white, odourless and homogenous without any signs of precipitation of drug, phase separation, creaming or any visual change of appearance in any of the samples kept at 5 and  $30^\circ\text{C}$ . At  $40^\circ\text{C}$ , ME's became unstable after 10 weeks storage. In terms of pH and conductivity (see 3.2.) ME's kept stable during six months until  $30^\circ\text{C}$ . Otherwise, viscosity tended to be lower at end-times (Table 3). Differences were not statistically significant ( $p > 0.05$ ) in all cases at ambient temperature (see Table 3).

The long-term physical stability of the ME's, predicted with the *Turbiscan Lab<sup>®</sup> Expert*, used only backscattered light (BS) because formulations were not transparent. No relevant variations of the droplet volume fraction (migration) or mean size (coalescence)

were observed on the ME's. Deviations of BS profiles were  $\leq 10\%$ , being slightly higher for JMLP01BT (Fig. 6). Stability is assumed acceptable at both times during the storage stability.

#### FIG. 6

### 3.6 Release test

Fig. 7 plots the BFZ release profiles (mean and SD) from the multiple emulsions, the commercial formulation and Meth-Sol (reference). After 5 h, mean percentages (Q5%) were 41.0 % and 48.8 % for JMLP01B0 and JMLP01BT (asymptotic).

#### FIG. 7

Based on AIC values, individual profiles were mostly best described with the Higuchi equation. Release profiles from "Meth-Sol" were mostly best described with a Weibull function.

Release parameters (mean  $\pm$  sd) are summarized in Table 5. Based on ANOVA test, Bonferroni's multiple comparison test of Higuchi coefficients uniquely showed differences between JMLP01B0 and the BFZ-CF (-472.3 to -9.075,  $p < 0.05$ ).

In addition, the highest efficiency, measured as  $AUC_0^5/Q5.T$ , was achieved with the polysorbate containing ME. Differences were not statistically significant ( $p > 0.05$ ).

#### TABLE 5

### 3.7 Skin permeation studies

Fig. 8 represents the mean skin permeation profiles of the three BFZ formulations. Permeation parameters and penetration values are summarized in Table 6. Statistically relevant ( $p < 0.05$ ) differences were found between drug penetration from JMLP01BT formulation and the other two formulations.

#### FIG. 8. TABLE 6

### 3.8 Skin Integrity Assessment

Changes of skin elasticity, hydration and TEWL before and after formulation applications over the forearm (at  $t_0$  and at  $t_1$ ) are summarized in Table 7. Statistical differences were found only for the elasticity variations in the polysorbate formulation compared with the other formulations (Fig. 9). Concerning the influence of polysorbate, lower variabilities were observed at  $t_1$  but no statistically significant changes of TEWL (at the same skin temperature) along time were observed with both ME's.

#### TABLE 7 and FIG. 9

## 4. Discussion

### 4.1. Formulation characteristics

Some advantages of hydrophilic  $W_1/O_1/W_2$  multiple emulsions are the protection of entrapped substances, their capacity to incorporate different actives in the different emulsion phases, and their sustained release effects (Silva et al., 1997). In this paper, the effect of polysorbate 80 over the ME's rheological properties and the resultant Bifonazole skin penetration have been investigated to improve the biopharmaceutical

properties of those formulations in comparison with a commercial O/W dispersion of Bifonazole containing cetyl stearyl alcohol and other non-ionic surfactants.

BFZ is practically insoluble in water (0.13 µg/mL, pH 7.4, 32 °C) and sparingly soluble in ethanol (Council of Europe, 2012; Elsayed, 2015). It has been fully dissolved in the lipophilic intermediate phase of the ME's, that means the 17.5 % of the total weight (Suñer et al., 2017a,b) according with Hameyer et al. (1996) who propose a range of 5 to 28 % (w/w) for the oily phase of ME's. As known from the literature, its composition (e.g. the polarity index) influences the size and morphology of both the internal aqueous droplets and the multiple  $W_1/O$  droplets (Omotoshio, 1986). In addition, since this oily phase limits the interaction between internal and external aqueous phases, it may influence the drug release pattern depending on the phase-distribution of the drug. The principal component, LP, is a synthetic medium chain (C8-10) triacylglycerol devoid of free fatty acids and mono- or diglycerides that achieves better interfacial properties than classical oils, assuring an acceptable stabilization. It is a good solvent for lipophilic active pharmaceutical ingredients and is associated with enhanced drug penetration. As described in several papers (Devani et al., 2004; Yang et al., 2002), LP generates multiple emulsions either alone or in the presence of polysorbate 80. Such mixtures allow greater solubilisation of hydrophobic model drugs. In the present work, it has been observed that the presence of Tween<sup>®</sup> 80 do not affects significantly the droplet size profile of the ME, as can be seen in Fig. 2 and Table 2.

Previous experiments elucidated the influence of polysorbate 80 co-emulsifier in the external aqueous phase. Polymeric surfactants in combination with the conventional small molecular-weight emulsifiers, are considered as promising emulsifiers for double emulsions (Garti, 1997). In our case, CDC is an ideal low HLB polymeric emulsifier to produce the initial  $W_1/O_1$  emulsion that can be later emulsified with an external aqueous gelified phase using another cooperative combination of surfactants containing the hydrophilic emulsifier (CMB) and polysorbate 80. In addition, polymeric surfactants can cross the lipid membranes by passive diffusion and interact with lipid bilayers (Mathot et al., 2007) which is useful to enhance the drug penetration in epidermic stratum corneum.

#### 4.2. Stability

Concerning long-term stability, conductimetric analysis detects potential leakage of electrolytes from the inner aqueous phase to the outer aqueous phase. An increase in conductivity would suggest a migration of electrolytes (Tedajo et al., 2001) as a result of diffusion or droplet breaking. In addition, strong osmotic impact of NaCl may cause destruction of the oily film and thus phase inversion (Tang et al., 2012). From our results, it can be considered that the fraction of NaCl released from the inner layer is not relevant due to the observed low conductivity values (Muguet et al., 2001) preserving the outer water phase during ageing ( $W_2$ ). Stability of the phase's distribution of this multiple emulsion is assumed.

Organoleptic characteristics and pH values have remained almost constant. pH values of both aqueous phases can influence the release profile of ionisable drugs (Raab et al., 1980; Nakhare et al., 1995). It is assumed that the addition of Tween<sup>®</sup> 80 slightly increases the pH of the ME's (El-Hadidy et al., 2012). Considering the pKa of Bifonazole (pKa=6.29) (Shalaeva et al., 2008) and the pH of Tween<sup>®</sup> 80 in aqueous

solution (pH = 7) (El-Hadidy et al., 2012), a neutral pH specification for the aqueous phases implies the presence of about a 50% of drug in ionized state, that facilitates both solubilisation and release to external phase.

Optical microscopic measurements searched for information about the structure and stability of ME's to confirm the multiple structure as shown in Fig. 1. Changes in overall size distribution and volume mean diameter during stability were also investigated with particle size laser analysis to detect eventual evolution of particle dimensions (Ursica et al., 2005). Correlations between calculated and measured data were used as an indication of how well the calculated data were fitted to the measurement data. (Malvern Instruments, 2007). No significant variations ( $\alpha=0.05$ ) of droplet size have been detected at the end of the study. Based on  $D[4,3]$  and  $D[3,2]$ , the maintenance of space-fill, the interfacial area and, thus, drug transport can be assumed (Marku et al., 2012). Considering  $D[v,0.9]$ , the 90 % of the W/O droplets fall below  $172.9\pm 6.3 \mu\text{m}$  for JMLP01B0, and  $168.1\pm 3.4 \mu\text{m}$  for JMLP01BT. No effect of Tween® 80 is detected.

Laser diffractometry uniquely measures the distribution of the external globule sizes. Consequently, the dispersed volume fraction is estimated as if the ME's were a simple O/W emulsion (Dickinson, 1991). Assuming that BFZ is dissolved in the continuous phase of the internal droplet, this simplification can be accepted as release-indicating. Otherwise, size distribution of the commercial formulation (Fig. 2) is clearly bimodal: larger peak is considered as the emulsion droplet size, (mean value  $59.0\pm 13.9 \mu\text{m}$ ), whereas the smaller size can be attributed to suspended drug crystals, also observed by optical microscopy under polarised-light.

The main advantage of NIR measurements (*Turbiscan Lab*®) is the premature detection of destabilization phenomena. In our case, only backscattered light was measured due to the opacity of the formulations (Lemarchand et al., 2003). This technique gives kinetic information on the process leading to phase separation, the ultimate step of the breaking as it permits discrimination between two kinds of destabilisation with dramatically different effects: particle migration (creaming, sedimentation) which is reversible by mechanical agitation and particle size variation (coalescence, flocculation) which is often irreversible (Mengual et al., 1999). An example is shown in Fig. 6. Resulting deviations were lower than 10 % for the entire height of the measurements and close to the baseline values during the 24 h study. Based on this instrumental inspection, the stability of the ME can be assumed (Celia et al., 2009) to be larger than the duration of the study.

#### 4.3. Rheology

Rheologic characteristics have been investigated to assess its effect over resulting skin application properties and as an indicator of stability (Grossiord et al., 1998; Vasiljevic et al., 2005; Krishnaiah et al., 2014). As is shown in Fig. 3, it can be assumed that the steady shear viscosity sharply decreases with an increase in shear rate from 0 to  $100 \text{ s}^{-1}$ . The flow curves demonstrate marked non-Newtonian pseudoplastic shear-thinning flow behaviour. Moreover, the flow curves (Fig. 3) indicated certain thixotropy as the rheograms displayed a hysteresis loop with the downward curve below the upward curve. It demonstrated a disturbance of the multiple emulsions microstructure under the effect of shear rate. In this case, the shear induces irreversible structural changes which could be interpreted as a breakup of multiple droplets without inversion producing a

decrease of volume fraction and consequently a decrease in the viscosity or a phase inversion to W/O producing a substitution of a more viscous phase for the external phase and consequently an enhancement of the viscosity values (Kawashima et al., 1991).

Cross equation has resulted the best descriptor for both multiple emulsions, suggesting similar pseudoplastic flux under shear and a good extensibility and spreadability on the skin surface. The Cross equation provides a general model for pseudoplastic materials. The addition of Tween® 80 has significantly increased viscosity and also thixotropy. Concerning a topical administration, the thixotropy is a desired property because it contributes to increase the retention of the formulation in the place of application (Silva et al., 2012). This fact, in line with the effect of carbomer, favours the adjustment of the required consistency of thixotropic formulations for an optimal application on large skin areas, as other authors have shown (Valenta et al., 2004). Pseudoplastic behaviour for microemulsions containing Tween® 80 was yet described by El-Hadidy et al. (2012), but they also mentioned a decrease in the viscosity and thixotropy, opposite to the effect observed with JMPLP01BT. Concerning the commercial formulation, its greater viscosity decreased more rapidly with shear rate (Fig. 4), showing a greater thixotropic effect. Some authors have described that the viscosity of MEs decreases during ageing. This may be due to i) diffusion of water molecules from the inner to the outer aqueous phase and then the volume decrease of globules in the  $W_1/O/W_2$  emulsions, or ii) bursting of multiple globules due to osmotic pressure (Tirnaksiz et al., 2005).

The oscillatory sweep stress and frequency sweep tests were used to find the linear viscoelastic region (LVR), the complex viscosity ( $\eta^*$ ), the storage modulus ( $G'$ ) that measures the ability of the system to store recoverable elastic energy, and the loss modulus ( $G''$ ) that reveals the dynamic viscosity associated with unrecoverable viscosity loss. As shown in Fig. 4-5 and Table 4, all formulations revealed a prevalence of the elastic over the viscous behaviour ( $G' > G''$ ). Jiao et al. (2002) described the same properties in their formulations containing Tween® 80, remarking the fluidity of formulation, just like JMPLP01B0 and JMPLP01BT. It is presumed that this elastic structure favours the structural stability and resistance to external forces for longer periods of time (Korhonen et al., 2000).

#### 4.4. Release and Permeation

The experimental setup of both release and permeation experiments is able for the purpose of the study. Spectrophotometric and chromatographic quantifications of BFZ were previously validated with acceptable linearity, precision, accuracy and recovery. Sink conditions are guaranteed in both cases. Mesh size of nylon membranes was clearly lower than droplet sizes, so it can be assured that the observed profiles are only due to the released amounts of drug. Determination of TEWL is a standard procedure to assess skin integrity before experiments. Higher values of TEWL in comparison with established standard values would suggest barrier defects (Klang et al., 2013).

The topical delivery of BFZ has been optimized searching for a similar skin permeation level and higher skin retention than a commercial formulation. Bifonazole appears to be comparable or superior to other antifungalazole derivatives in the treatment of tinea versicolor and dermatophytic infections but not against cutaneous candidiasis (Fromtling, 1985). Given that, these fungi commonly affect the cornified layers of the

skin and the dermis (Quatresooz et al., 2008), the intradermal retention of bifonazole appears as an indicator of an efficient delivery.

Release profiles of BFZ from the ME's have been described with the Higuchi function (square root), suggesting a depletion limited process and reaching asymptotic values after 5 h. It can be said that the oily intermediate phase acts as a reservoir-like, maintaining the drug saturation in the external aqueous phase, to achieve an enhanced skin saturation. The efficiency of the release profiles, commonly measured with Eq. 7 as suggested by Khan (1975), was maximum for JMLP01BT. This value is directly proportional with the accumulation of the drug in skin.

Skin permeation levels resulted to be ca.  $10^{-3}$  times lower than the corresponding release levels. This difference is explained in terms of the high lipophilicity of imidazolic drugs and its consequent low permeability. Resultant values of BFZ permeation flux are slightly lower than those obtained by Hashiguchi et al. (1988) with a BFZ lipophilic suspension through mouse skin ( $0.3386 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$ ). Similarly, Hoppel et al. (2014) found a higher skin permeation and penetration of 5-fluorouracil from multiple emulsions in comparison to an O/W macroemulsion.

Formulation of drugs with limited permeability and solubility (class IV) poses a particular opportunity for a topical administration due to their poor systemic absorption. For imidazolic antifungals, the barrier function of the skin plays a decisive role on drug penetration. In fact, pharmacokinetic studies in animals and humans have confirmed topical bifonazole to be well tolerated (Fromtling, 1988) because systemic absorption following topical application is minimal (Vasiljevic et al., 2005; Krishnaiah et al., 2014). In this sense, the duration of the antimycotic effect will depend on the extent of retention in the skin outer layers (Plempel et al., 1983). It is known that imidazolic drugs are prone to reversible bind to queratin in stratum corneum in direct relationship with its lipophilicity (Hashiguchi et al., 1998) and its efficacy can remain for prolonged time periods. In fact, based on its clinical efficacy against dermatophytes, topical Bifonazole is recommended to be applied once every 24 h during two or three weeks (Quatresooz et al., 2008; Plempel et al., 1983; Polak, 1984; Ritter et al., 1987; SmPc Canesmycospor, 2015). It seems clear that there is an additional physicochemical component requiring high concentrations of drug to achieve a fungicidal event (Beggs et al., 1987).

There is an experimental evidence that bifonazole penetrates into the skin to a considerable extent, while only an extremely low proportion permeates through the skin. Studies of drug penetration show that, even in the lower layers of the epidermis, bifonazole is present in amounts several times higher than the *in vitro* minimum inhibitory concentrations for dermatophytes, especially along the hair follicles as the preferred route of penetration (Patzschke et al., 1983). This marked intracutaneous distribution of bifonazole is observed, also, in guinea pig skin, detecting (at 2h) around  $300 \mu\text{g}/\text{g}$  in stratum corneum but only  $25 \mu\text{g}/\text{g}$  in epidermis (Sobue et al., 2004). In our case, drug accumulation achieved with both multiple emulsions is higher than the levels obtained with the commercial cream ( $0.4 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ). Those results suggest that drug is relected in the lipophilic skin regions reducing dramatically its apparent permeation through dermis (Klang et al., 2012; Baker et al., 1995) which favours its antifungal activity in the epidermic tissue.

It is commonly known that the penetration of topically applied drugs is clearly related with the type of vehicle (Daniels et al., 2007). Obtained retention levels of Bifonazole, expressed in different ways (Vázquez et al., 2014) are summarized in Table 6. Drug penetration levels from the no-Tween<sup>®</sup> formulation ( $2.9 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) are similar to those that obtained Hashiguchi et al. (1988) with bifonazole suspended in isopropyl myristate ( $2.4 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) in mouse skin but they appear to be more efficient because the percutaneous flux and systemic absorption in humans is intrinsically lower than in rodents.

Concerning the polysorbate-containing formulation, the skin accumulation levels are statistically higher ( $16.6 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) than the others (Table 6). The formulation with polysorbate 80 has dramatically increased this accumulation inside the  $400 \mu\text{m}$  skin samples. A similar effect has been described by Mohammed et al. (2014), who directly relates the amounts of drug in stratum corneum with the corresponding uptake of the excipient in stratum corneum. Similarly to the results obtained by Bachhav et al. (2011) with econazole micelles, this significant increase in skin deposition achieved with multiple emulsions demonstrates their ability to improve cutaneous drug bioavailability. This may translate into an improved clinical efficacy *in vivo*.

Polysorbates are a group Polyoxyethylene sorbitan esters ubiquitously used as solubilizers. Different grades are available depending on the sterified fatty acid composition. For our purpose, monooleate (grade 80) was preferred to achieve the best interaction with LP triglyceride in the oily phase and, at the same time, to enhance the skin penetration in stratum corneum. In case of non-ionic surfactants as permeation enhancers, similarity of aliphatic molecules is concordant with similar enhancer activities (Lopez et al., 2000). The effect of Tween<sup>®</sup> 80 over lipophilic drugs ( $\log P$  above 4.15) through rat mucosal membranes (Salimi et al., 2016) is related with an increase in diffusion coefficient that enhances the drug transport.

#### 4.5. Skin integrity

Concerning the influence of Tween<sup>®</sup> 80 on skin integrity, it is known that Tween 80 lacks of antifungal activity and is biocompatible with fungal strains (Garon et al., 2002), but it can cause anaphylactic reactions (non-immunological) in prone individuals, although sensitization in selected patients with contact dermatitis is quite rare (Tosti et al., 1990; Coors et al., 2005). Current results of hydration, elasticity and TEWL with the MEs suggest an acceptable skin integrity confirming that, in all cases, skin hydration remained unaffected by the formulation components after one hour of application. This impact has been used by other authors (Smits et al., 2015) to describe the humectant effect of certain drugs. For example, hyperhidrosis is an indicator of skinhealing in anti-mycotic treatments (Nielsen, 1984).

Relating the innocuity of the ME formulations, significant differences ( $P < 0.05$ ) were obtained only with elasticity differences ( $t_1 - t_0$ ) between the polysorbate-containing ME and the commercial formulation. Those differences were considered as non-irritancy relevant because they did not affect the variations of transepidermal water permeability, that is described as an indicator of skin integrity (Nguyen et al., 2017). All this facts suggest a non-irritating effect of polysorbate over the skin.

In addition with its acceptable innocuity, polysorbate 80 is particularly useful to solubilize hydrophobic organic compounds and movilize them from porous substrates (Cheng et al., 2017). It points it as an interesting surfactant for a topical formulation intending to optimize the delivery of bifonazole to the epidermic stratum corneum.



## 5. Conclusions

In summary, bifonazole formulated in those multiple emulsions shows a clearly lower skin permeation and a higher skin retention in comparison with a conventional cream formulation. This achievement can be attributed to the hydrophilic nature of this formulation and the presence of solubilizing surfactants in the external interphase that stabilize the oily phase and dissolve the drug in a small amount (17 %) of the total formulation weight. It is shown that the presence of polysorbate 80 (Tween 80®) especially enhances the drug accumulation in skin for a more efficient dermatomycotic treatment. Given that the biophase of this antifungal against *Tinea* and *Pytiriasis* is located in the epidermal stratum corneum, this effect of polysorbate 80 favours its presence in target tissues infected by superficial dermatophytoses.

The addition of polysorbate 80 forced an increase in pH, viscosity and viscoelasticity, and a decrease of spreadability. Rheological behaviour of the formulation with polysorbate is an interesting alternative for dermal application in skin fungal infections. Accordingly, the proposed antifungal multiple emulsion is a preferred choice for the epidermal delivery of bifonazole and a good alternative to the commercially available formulations for the treatment of dermatomycoses.

## ACKNOWLEDGMENTS

Authors would like to acknowledge Prof. Dra. Coloma Barbé-Rocabert (+) at the Pharmaceutical Technology Department of the University of Barcelona, who initiated this research line and would have enjoyed reading this paper.

## 6. References

1. Abdul Bari, M.A., 2013. Comparison of Superficial Mycosis treatment using Butenafine and Bifonazole nitrate Clinical Efficacy. *Global J. Health Sci.*, Vol. 5, No. 1.
2. Bachhav, YG., Mondon, K., Kalia, YN., Gumy, R., Moller, M., 2011. Novel micelle formulation to increase cutaneous bioavailability of azole antifungals. *J. Control. Release*, 153, 126–132.
3. Baker, EJ., Hadgraft, J., 1995. In vitro percutaneous absorption of arildone, a highly lipophilic drug, and the apparent no-effect of the penetration enhancer Azone in excised human skin. *Pharm Res.*, 12(7), 993-997.
4. Beggs, WH., Hughes, CE., 1987. Exploitation of the direct cell damaging action of antifungal azoles. *Diagn. Microb. Infect. Dis.*, 6, 1-3.
5. Bseiso, EA., Nasr, M., Sammour, O., 2015. Recent advances in topical formulation carriers of antifungal agents. *Indian J Dermatol Venereol Leprol.*, 81(5), 457-63.
6. 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. *Coll. Surf B: Biointerfaces*, 72, 155–160.
7. Cheng, M., Zeng, G., Huang, D., Yang, C., Lai, C., Zhang, C., Liu, Y., 2017. Advantages and challenges of Tween 80 surfactant-enhanced technologies for the remediation of soils contaminated with hydrophobic organic compounds. *Chemical Engineering Journal*, 314, 98–113.
8. Coors, EA., Seybold, H., Merk, HF., Mahler, V., 2005. Polysorbate 80 in medical products and nonimmunologic anaphylactoid reactions. *Ann. Allergy Asthma Immunol.*, 95, 593–599.

9. Costa P., Sousa, J.M., 2001. Modeling and comparison of dissolution profiles. *Eur. J.Pharm. Sci.*, 13, 123–133.
10. Council of Europe, 2012. The European Pharmacopoeia Commission. Econazole monograph 04/2012: p. 1395. Strasbourg Cedex, France.
11. Čudina, O.A., Čomor, M.I., Janković, I.A., 2005. Simultaneous Determination of Bifonazole and Benzyl Alcohol in Pharmaceutical Formulations by Reverse-Phase HPLC. *Chroma.*, 61(7), 415–418.
12. Daniels, R., Knie, U., 2007. Galenics of dermal products-vehicles, properties and drug release. *J Dtsch Dermatol Ges.*, 5, 367–83.
13. Devani, M., Ashford, M., Craig, DQM., 2004. The emulsification and solubilisation properties of polyglycolysed oils in self-emulsifying formulations. *J. Pharm. Pharmacol.*, 56(3), 307–16.
14. Dickinson, E., Evison, J., Owusu, R.K., 1991. Preparation of fine protein-stabilized water-in-oil-in water emulsions, *Food Hydrocolloids*, 5, 481–485.
15. El-Hadidy, G.N., Ibrahim, H.K., Mohamed, M.I., El-Milligi, M.F., 2012. Microemulsions as vehicles for topical administration of voriconazole: formulation and in vitro evaluation. *Drug Dev. Ind. Pharm.*, 38(1), 64–72.
16. Elsayed, M.A., 2015. Development of topical therapeutics for management of onychomycosis and other nail disorders: A pharmaceutical perspective. *J. Control. Release*, 199, 132–144.
17. European Medicines Agency (EMA), 2011. Guideline on validation of bioanalytical methods, document reference EMA/CHMP/EWP/192217/2009. London, EMA.
18. Firooz, A., Nafisi, S., Maibach, H.I., 2015. Novel drug delivery strategies for improving econazole antifungal action. *Int. J. Pharm.*, 495, 599–607.
19. Fromtling, R. A., 1985. Bifonazole (MycosporRp) an update. *Drugs Today*, 21, 401–404.
20. Fromtling, R.A., 1988. Overview of medically important antifungal azole derivatives. *Clin. Microbiol. Rev.*, 1(2), 187–217.
21. Garon, D., Krivobok, S., Wouessidjewe, D., Seigle-Murandi, F., 2002. Influence of surfactants on solubilization and fungal degradation of fluorene. *Chemosphere*, 47, 303–309.
22. Garti, N., 1997. Double emulsions-scope, limitations and new achievements. *Colloids Surf.*, 123-124, 233-246.
23. Grossiord, J.L., Seiller, M., 1998. Multiple Emulsion: Structure, Properties and Applications, Editions de Santé, Paris.
24. Güngör, S., Erdal, M.S., Buket, A., 2013. New Formulation Strategies in Topical Antifungal Therapy. *Journal of Cosmetics, Dermatological Sciences and Applications*, 3, 56-65.
25. Gupta, A.K., Chow, M., Daniel, C.R., Aly R., 2003. Treatments of tinea pedis. *Dermatol. Clin.*, 21, 431-462.
26. Hameyer, P., Jenni, K.R., 1996. Emulsifiers for multiple emulsions. *Cosm. and Toil.*, 111, 39-48.
27. Hashiguchi, T., Kodama, A., Ryu, A., Otagiri, M., 1998. Retention capacity of topical imidazole antifungal agents in the skin. *Int. J. Pharm.*, 161, 195-204.
28. Hoppel, M., Mahrhauser, D., Stallinger, C., Wagner, F., Wirth, M., Valenta, C., 2014. Natural polymer-stabilized multiple water-in-oil-in-water emulsions: a novel dermal drug delivery system for 5-fluorouracil. *J. Pharm. Pharmacol.*, 66(5), 658–667.

29. Jiao, J., Rhodes, D.G., Burgess, D.J., 2002. Multiple emulsion stability: Pressure balance and Interfacial Film strength. *J. Coll. Int. Sci.*, 250, 444-450.
30. Kawashima, Y., Hino, T., Takeuchi, H., Niwa, T., Horibe, K., 1991. Rheological study of w/o/w emulsions by a cone-and-plate viscometer: negative thixotropy and shear-induced phase inversion. *Int. J. Pharm.*, 72, 65-77.
31. Keshary, PR., Huang, YC., Chien, YW., 1985. Mechanism of transdermal controlled nitroglycerin administration (III): Control of skin permeation rate and optimization. *Drug Dev. Ind. Pharm.*, 11, 1213-1253.
32. Khan, KA., 1975. The concept of dissolution efficiency. *J. Pharm. Pharmacol.*, 27, 48-49.
33. Klang, V., Haberfeld, S., Hartl, A., Valenta, C., 2012. Effect of  $\gamma$ -cyclodextrin on the in vitro skin permeation of a steroidal drug from nanoemulsions: Impact of experimental setup. *Int. J. Pharm.*, 423, 535-542.
34. Klang, V., Schwarz, JC., Haberfeld, S., Xiao, P., Wirth, M., Valenta, C., 2013. Skin integrity testing and monitoring of in vitro tape stripping by capacitance-based sensor imaging. *Skin Res. Technology*, 19, e259-e272.
35. Korhonen, M., Niskanen, H., Kiesvaara, J., Yliruusi, J., 2000. Determination of optimal combination of surfactants in creams using rheology measurements. *Int. J. Pharm.* 197, 143-151.
36. Krishnaiah, YS., Xu X., Rahman, Z., Yang, Y., Katragadda, U., Lionberger, R., Peters, JR., Uhl K., Khan, MA., 2014. Development of performance matrix for generic product equivalence of acyclovir topical creams. *Int. J. Pharm.*, 475(1-2), 110-22.
37. Lemarchand, C., Couvreur, P., Vauthier, C., Constatini, D., Gref, R., 2003. Study of emulsion by graft copolymers using the optical analyser Turbiscan. *Int. J. Pharm.*, 254, 77-82.
38. Lopez Castellano, A., Cortell Ivars, C., Lopez Carballo, G., Herraiz Dominguez, M., 2000. The influence of Span<sup>®</sup> 20 on stratum corneum lipids in Langmuir monolayers: comparison with Azone<sup>®</sup>. *Int. J. Pharm.*, 203, 245-253.
39. Malvern Instruments Ltd., Mastersizer 2000. User Manual, 2007. Worcestershire, United Kingdom.
40. Marku, D., Wahlgren, M., Rayner, M., Sjöö, M., Tingren, A., 2012. Characterization of starch Pickering emulsions for potential applications in topical formulations. *Int. J. Pharm.*, 428, 1-7.
41. Mathot, F., Schanck, A., Van Bambeke, F., Ariën, Noppe M., Brewster, M., Préat, V., 2007. Passive diffusion of polymeric surfactants across lipid bilayers. *J. Control. Release*, 120, 79-87.
42. Matsumoto, S., Kita, Y., Yonezawa, D., 1976. An attempt at preparing water-in-oil-in water multiple-phase emulsions. *J. Coll. Int. Sci.*, 57, 353-361.
43. Mengual, O., Meunier, G., Cayre, I., Puech, K., Snabre, P., 1999. Characterisation of instability of concentrated dispersions by anew optical analyser: the TURBISCAN MA 1000. *Colloids Surf: Physicochem. Eng. Aspects*, 152, 111-123.
44. Mohammed, D., Matts, P.J., Hadgraft, J., Lane, ME., 2014. In Vitro-In Vivo Correlation in Skin Permeation. *Pharm. Res.*, 31, 394-400
45. Muguet, V., Seiller, M., Barratt, G., Ozer, O., Marty, JP., Grossiord, JL., 2001. Formulation of shear rate sensitive multiple emulsions. *J. Control. Release*, 70(1-2), 37-49.
46. Nakhare, S., Vyas, S.P., 1995. Prolonged release multiple emulsion based system bearing rifampicin: in vitro characterisation. *Drug Dev. Ind. Pharm.*, 21(7), 869-878.

47. Neto, P., Ferreira, M., Bahia, F., Costa, P., 2013. Improvement of the methods for skin mechanical properties evaluation through correlation between different techniques and factor analysis. *Skin Res. Technol.*, 19(4), 405–16.
48. Nguyen, HX., Puri, A., Banga, AK., 2017. Methods to simulate rubbing of topical formulation for in vitro skin permeation studies. *Int. J. Pharm.*, 519, 22–33.
49. Nielsen, P.G., 1984. The Importance of the Vehicle in the Treatment of Dermatophytosis in Hereditary Palmo-Plantar Keratoderma. *Mycoses*, 27, 227–230.
50. Oestmann, E., Lavrijsen, AP., Hermans, J., Ponec, M., 1993. Skin barrier function in healthy volunteers as assessed by transepidermal water loss and vascular response to hexyl nicotinate: intra- and inter-individual variability. *Br. J. Dermatol.*, 128(2), 130–6.
51. Omotosho, JA., Whateley, TL., Law, TK., Florence, AT., 1986. The nature of the oil phase and the release of solutes from multiple (o/w/o) emulsions. *J. Pharm. Pharmacol.*, 38, 865–870.
52. Park, EK., Song, KW., 2010. Rheological evaluation of petroleum jelly as a base material in ointment and cream formulations: steady shear flow behaviour. *Arch. Pharm. Res.*, 33, 141–150.
53. Patzschke, K., Ritter, W., Siefert, HM., Weber H., Wegner LA., 1983. Pharmacokinetic studies following systemic and topical administration of [14C]-Bifonazole in Man. *Arzneimittelforschung*. 33(5), 745- 750.
54. Plempel, M., Regel, E., Büchel, KH., 1983. Antimycotic efficacy of Bifonazole in vitro and in vivo. *Arzneim-Forsch.* 33(4), 517-524.
55. Polak, A., 1984. Antifungal activity of four antifungal drugs in the cutaneous retention time test. *Sabouraudia. J. Med. Vet. Mycol.* 22, 501-503.
56. Popović, G., Čakar, M., Agbaba, D., 2003. Determination of bifonazole in creams containing methyl- and propyl p-hydroxybenzoate by derivative spectrophotometric method. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 33(1), 131–136.
57. Quatresooz, P., Piérard-Franchimont, C., Arrese, JE., Piérard, GE., 2008. Clinicopathologic presentations of dermatomycoses in cancer patients. *J. Eur. Acad. Derm. Venereol.*, 22, 907–917.
58. Raab, WPE., 1980. *The Treatment of Mycosis with Imidazole Derivatives*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg.
59. Ritter, W., Siefert, H.M., 1987. Biological disposition and percutaneous absorption of bifonazole in animals and man, p. 383–405. In R. A. Fromtling (ed.), *Recent trends in the discovery, development and evaluation of antifungal agents*. J. R. Prous Publishers, Barcelona.
60. Salimi, A., Hedayatipour, N., Moghimipour, E., 2016. The Effect of Various Vehicles on the Naproxen Permeability through Rat Skin: A Mechanistic Study by DSC and FT-IR Techniques. *Adv. Pharm. Bull.*, 6(1), 9-16.
61. Seifriz, W., 1925. Studies in emulsion III. Double reversal of oil emulsions occasioned by the same electrolyte, *J. Phys. Chem.*, 29, 738–749.
62. Shalaeva, M., Kenseth, J., Lombard, F., Batin, A., 2008. Measurement of dissociation constants (pKa Values) of organic compounds by multiplexed capillary electrophoresis using aqueous and cosolvent buffers. *J. Pharm. Sci.*, 97(7), 2581–606.
63. Silva, A., Grossiord, JL., Puiseux, F., Seiller, M., 1997. Insulin in W/O/W multiple emulsions: preparation, characterization and determination of stability towards proteases in vitro. *J. Microencap.*, 14(3), 311–319.
64. Silva, AC., Amaral, MH., González-Mira, E., Santos, D., Ferreira, D., 2012. Solid lipid nanoparticles (SLN) based hydrogels as potential carriers for oral transmucosal

- delivery of Risperidone: Preparation and characterization studies. *Coll. Surf B: Biointerfaces*, 93, 241-248.
65. Smits, J., Weibel, M., Herbst, N., 2015. Hydro-Gain®. Un Sistema humectante de origen vegetal que estimula la hidratación de la piel y fortalece la barrera lipídica. *Noticias de Cosmética y Perfumería (NCP)*. 342, 16-24.
  66. SmPC Canesmycospor®. Bayer Hispania SL. Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios. Revised on 02/2015.
  67. Sobue, S., Sekiguchi, K., 2004. Difference in Percutaneous Absorption and Intracutaneous Distribution in Guinea Pigs among Topical Antifungal Drugs (Tioconazole Solution, Tioconazole Cream, Miconazole Nitrate Solution and Bifonazole Solution). *Biol. Pharm. Bull.*, 27(9), 1428-1432.
  68. Suñer, J., Boix, A., Halbaut, L., Velázquez, N., Zamarbide, J., Bozal-de-Febrer, N., Calpena, A.C., 2017a. Skin permeation of Econazole nitrate formulated in an enhanced hydrophilic multiple emulsion. *Mycoses*. 60, 166-177
  69. Suñer, J., Calpena, A.C., Clares, B., Cañadas, C., Halbaut, L., 2017b. Development of Clotrimazole Multiple W/O/W Emulsions as Vehicles for Drug Delivery: Effects of Additives on Emulsion Stability. *AAPS PharmSciTech.*, 18(2), 539-550.
  70. Tang, SY., Sivakumar, M., Ng, P., Shridharan, AMH., 2012. Anti-inflammatory and analgesic activity of novel oral aspirin-loaded nanoemulsion and nano-multiple emulsion formulations generated using ultrasound cavitation, *Int. J. Pharm.*, 430, 299-306.
  71. Tedajo, GM., Seiller, M., Prognon, P., Grossiord, JL., 2001. pH compartmented w/o/w multiple emulsion: a diffusion study. *J. Control. Release*, 75(1-2), 45-53.
  72. Tirnaksiz, F., Kalsin, O., 2005. A topical w/o/w multiple emulsions prepared with Tetronic 908 as a hydrophilic surfactant: formulation, characterization and release study. *J. Pharm. Pharm. Sci.*, 8, 299-315.
  73. Tosti, A., Guerra, L., Morelli, R., Barda, F., 1990. Prevalence and sources of sensitization to emulsifiers: a clinical study. *Contact. Dermatitis*, 23, 68-72.
  74. Ursica, L., Tita, D., Palici, I., Tita, B., Vlaia, V. 2005. Particle size analysis of some water/oil/water multiple emulsions. *J. Pharm. Biom. Anal.*, 37, 931-936.
  75. Valenta, C., Schultz, K., 2004. Influence of carrageenan on the rheology and skin permeation of microemulsion formulations. *J. Controlled Rel.*, 95, 257- 265
  76. Vasiljevic, D., Vuleta, G., Primorac, M., 2005. The characterization of the semi-solid W/O/W emulsions with low concentrations of the primary polymeric emulsifier. *Int. J. Cosm. Sci.*, 27, 81-87.
  77. Vázquez-González, ML., Bernad, R., Calpena A.C., Domènech, O., Montero M.T., Hernández-Borrell, J., 2014. Improving ex vivo skin permeation of non-steroidal anti-inflammatory drugs: Enhancing extemporaneous transformation of liposomes into planar lipid bilayers. *Int. J. Pharmac.*, 461, 427-436.
  78. 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, 165-75.
  79. Yang, JH., Kim, YI., Kim, KM., 2002. Preparation and evaluation of aceclofenac microemulsion for transdermal delivery system. *Arch. Pharm. Res.*, 25(4), 534-540.

Components	Percentage composition (w/w)	
	JMLP01B0	JMLP01BT
<b>Oily phase (O<sub>1</sub>)</b>		
Bifonazole (BFZ)	1.00	1.00
Capric/caprylic triglyceride (LP, Labrafac <sup>®</sup> Lipophile 1349)	11.00	11.00
Cetyl dimethicone copolyol (CDC, Abil <sup>®</sup> EM 90)	1.50	1.50
Sorbitan stearate (Span <sup>®</sup> 60)	2.00	2.00
Cetyl palmitate (CP)	2.00	2.00
<b>Internal aqueous phase (W<sub>1</sub>)</b>		
Sodium chloride	0.25	0.25
Purified water at pH 6.6	32.25	32.25
<b>External aqueous phase (W<sub>2</sub>)</b>		
Carbomer (TGC, Tego <sup>®</sup> Carbomer 341)	0.20	0.20
Cocamidopropyl betaine (CMB, Tego <sup>®</sup> Betaine F)	0.70	0.70
Polysorbate 80 (Tween <sup>®</sup> 80)	-	1.00
Purified water at pH 6.6	49.10	48.10

Table 1: Formulation and percentage composition (w/w) of BFZ multiple emulsions.

Parameter	Particle size analyses (µm)		
	JMLP01B0	JMLP01BT	BFZ-CF
D[4,3]	65.2±0.8	68.5±1.0	29.8±9.8
D[3,2]	9.7±0.2	12.8±0.1	5.8±0.5
D[v,0.1]	3.4±0.3	6.0±0.2	1.8±0.2
D[v,0.5]	35.8±0.3	40.4±5.6	18.0±2.1
D[v,0.9]	172.9±6.3	168.1±3.4	59.0±13.9

Table 2: Particle size parameters by laser diffraction for BFZ-ME's at 24 h and BFZ-CF (mean ± SD, n = 3)

Formulation	Frequency (s <sup>-1</sup> )	Viscosity values	
		at 24 h	180 days
JMLP01B0	10 s <sup>-1</sup>	1745.0±16.7	1705.0±15.7
	100 s <sup>-1</sup>	237.5±4.7	205.8±2.6
JMLP01BT	10 s <sup>-1</sup>	2176.0±24.6	2093.5±19.9
	100 s <sup>-1</sup>	295.8±6.8	261.2±4.1
BFZ-CF	10 s <sup>-1</sup>	19301.7±99.7	19240.5±116.9
	100 s <sup>-1</sup>	1901.3±30.9	1963.0 ±23.7

Table 3: Mean viscosity values (mPa.s) at 10 s<sup>-1</sup> and 100 s<sup>-1</sup> of both ME's and BFZ-CF (mean ± SD, n = 3) at 24 h and 180 days after preparation.

OSCILLATORY TEST		JMLP01B0	JMLP01BT
Storage modulus ( $G'$ )	at 0.01 Hz	62.08 Pa	81.99 Pa
	at 10 Hz	85.09 Pa	167.60 Pa
Loss modulus ( $G''$ )	at 0.01 Hz	19.47 Pa	30.29 Pa
	at 10 Hz	27.45 Pa	60.97 Pa
Complex viscosity ( $\eta^*$ )	at 0.01 Hz	1035.00 Pa·s	1391.00 Pa·s
	at 10 Hz	1.42 Pa·s	2.84 Pa·s

Table 4: Oscillatory test characterization of JMLP01B0 and JMLP01BT ME's at 24 h of preparation.

Formulation	Release parameters				$AUC_0^5/(Q5.T)$ (h)
	Higuchi	Weibull			
	K ( $\mu\text{g} \cdot \text{h}^{-1/2}$ )	$Q^\infty$ ( $\mu\text{g}$ )	$\beta$	$t_d$ (h)	
JMLP01B0	539.3±71.5	-	-	-	0.644±0.072
JMLP01BT	690.4±97.8	-	-	-	0.716±0.026
BFZ-CF	780.0±87.5*	-	-	-	0.692±0.098
Meth-Sol	-	2157.0±114.4	9.6±5.5	0.161±0.009	-

Table 5: Release parameters for the different formulations and the methanolic solution (mean ± SD, n = 3). Statistical differences are indicated with the superscript “\*”.

Formulations	Drug permeation	Drug penetration		
	Flux ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2 \cdot \text{h}$ )	( $\mu\text{g}/\text{g}$ )	( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ )	( $\mu\text{g}/\text{cm}^2 \cdot \text{mg}$ )
JMLP01B0	0.137±0.008	13.12± 1.24	2.87± 0.36	20.50± 1.93
JMLP01BT	0.064±0.012*	106.20± 8.73	16.60± 7.09	165.93± 13.64
BFZ-CF	0.132±0.009	4.91± 0.72	0.38± 0.07	7.67± 1.56

Table 6: Drug permeation and penetration through human skin from the ME's and the commercial formulation (mean± SD, n=3). Statistical differences are indicated with the superscript “\*”.

Formulations	Skin Elasticity mean differences (AU)	Skin Hydration mean differences (AU)	TEWL mean differences ( $\text{g}/\text{h} \cdot \text{m}^2$ )
JMLP01B0	0.0521±0.003	8.1±7.8	3.6±1.4
JMLP01BT	0.2232±0.03*	3.6±1.4	3.6±1.9
BFZ-CF	0.1605±0.04	6.0±6.5	1.5±2.3

Table 7: Results of skin integrity tests of JMLP01B0, JMLP01BT and BFZ-CF (mean ± SD, n = 3). Statistical differences are indicated with the superscript “\*”.

Fig. 1: Photomicrographs of JMLP01B0, JMLP01BT (at 24 h of preparation) and BFZ-CR at 400x magnification respectively. Samples were diluted at 1:20.

Fig. 2: Particle size distribution for JMLP01B0, JMLP01BT and BFZ-CF as volume percentages.

Fig. 3: Viscosity (a) and Flow (b) curves of ME's after 24 h of preparation as a function of shear rate.

Fig. 4: Viscosity and Flow curve of BFZ-CF as a function of shear rate.

Fig. 5: Storage modulus ( $G'$ ), loss modulus ( $G''$ ) and phase angle ( $\delta$ ) of JMLP01B0 and JMLP01BT during a sweep stress test (top). Storage modulus ( $G'$ ), loss modulus ( $G''$ ) and complex viscosity ( $\eta^*$ ) versus frequency during a frequency sweep test for JMLP01B0 and JMLP01BT (bottom).

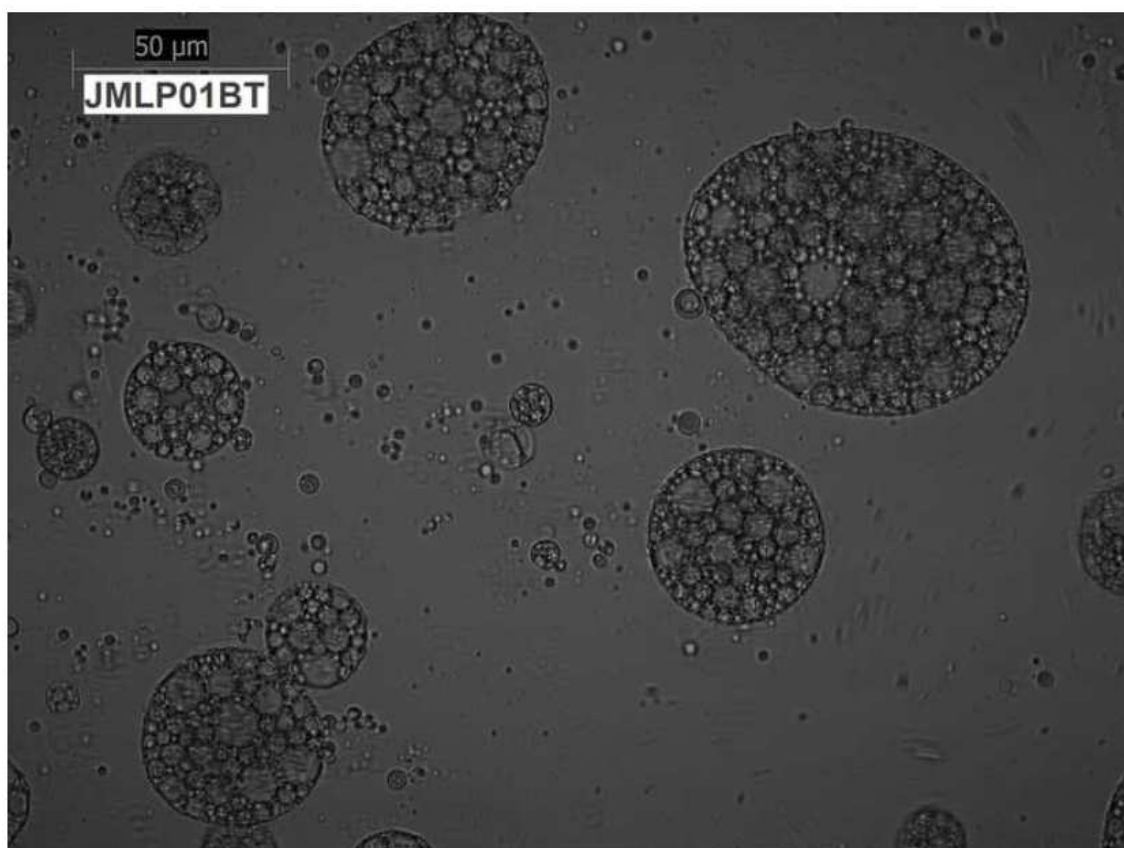
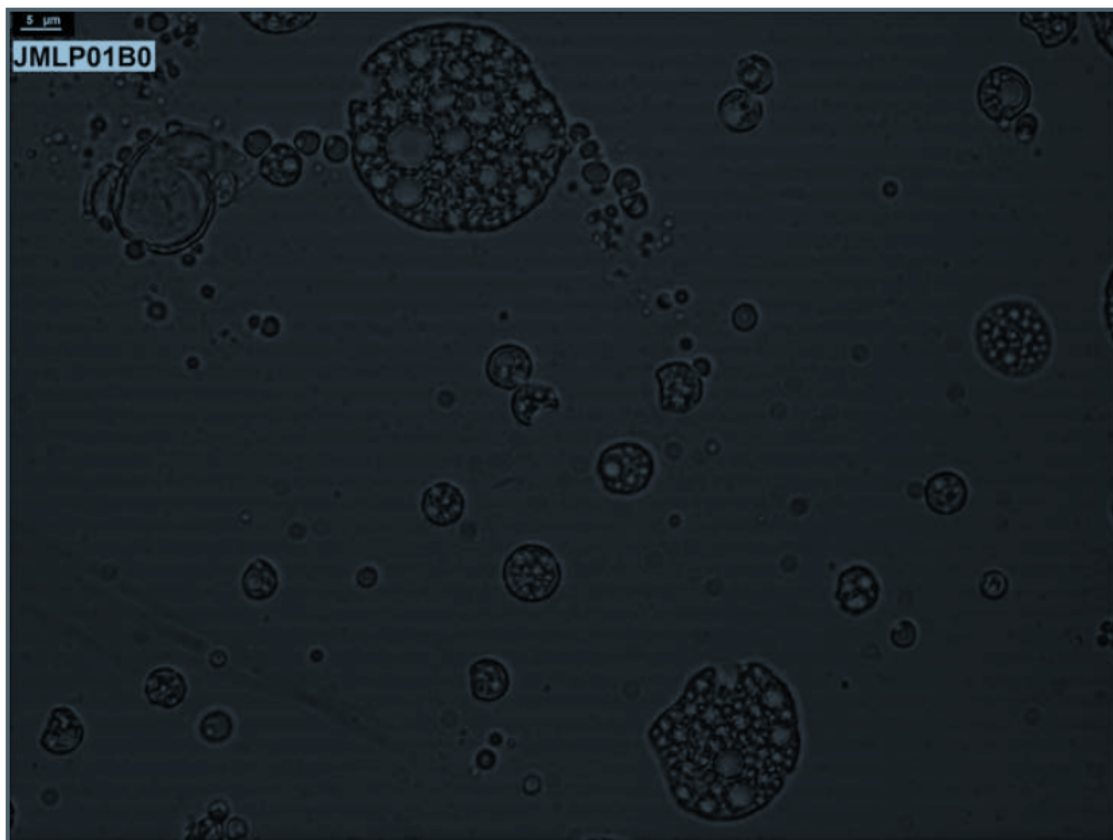
Fig. 6: Backscattering profiles ( $\% \Delta \text{BS}$ , left ordinates) recorded at room temperature of JMLP01B0 (top) and JMLP01BT (bottom) at different times (0:00 to 24:00 h, right ordinates). Sample cell length (0 to 50 mm) on abscissae.

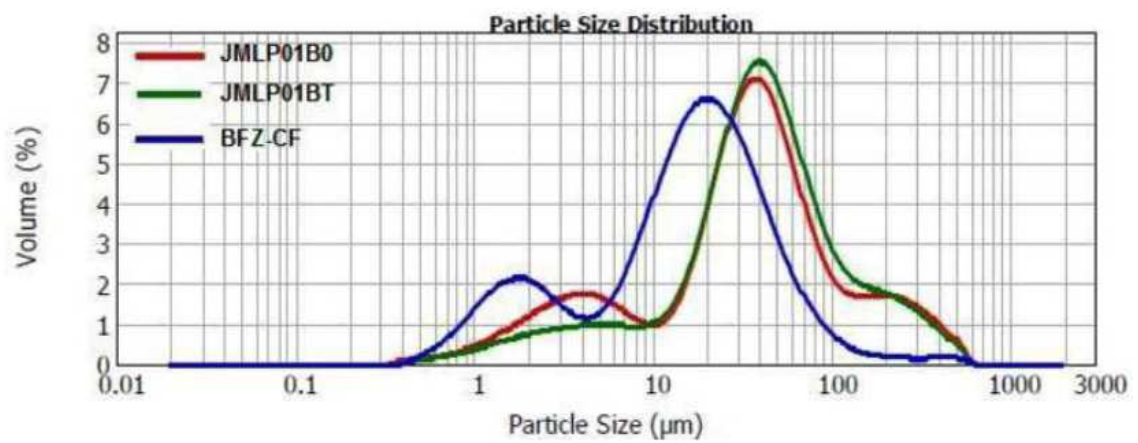
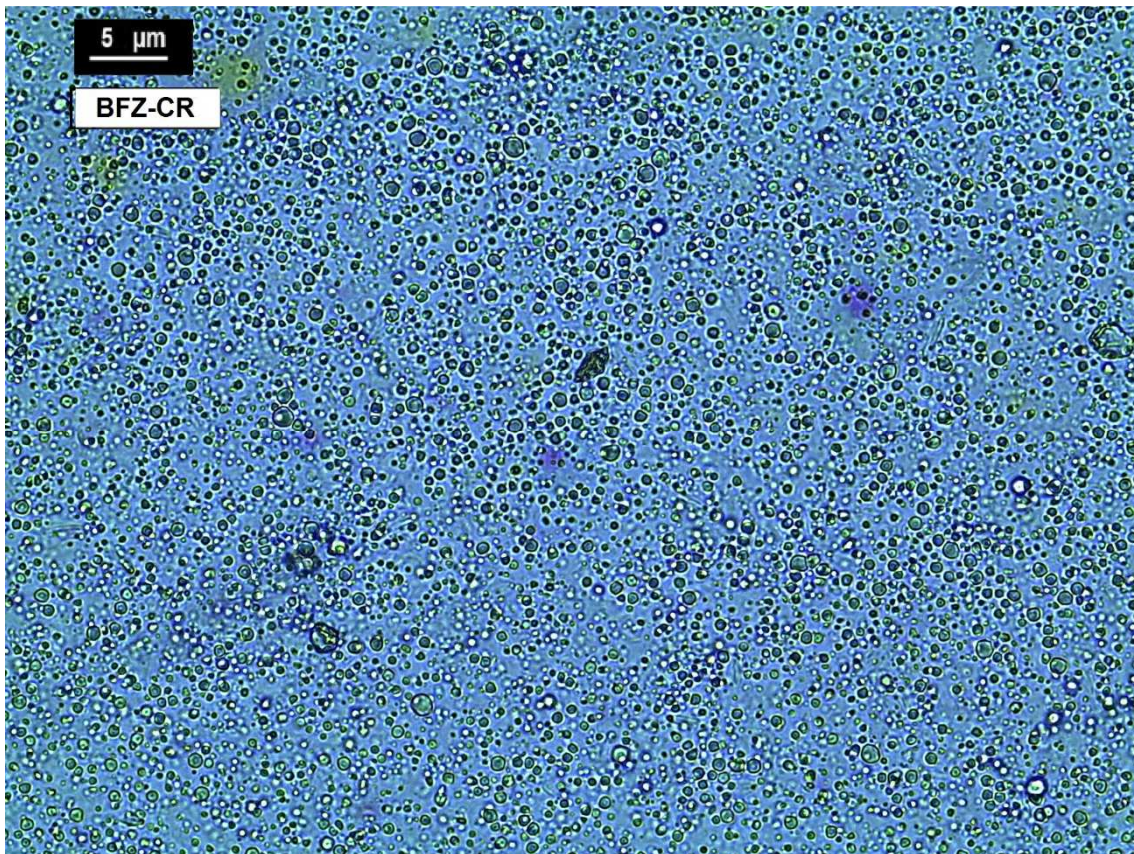
Fig. 7: Cumulative release amounts (mean values and standard deviations) of Bifonazole formulations (squares JMLP01B0, triangles up JMLP01BT, triangles down commercial reference, rhombus Meth-Sol).

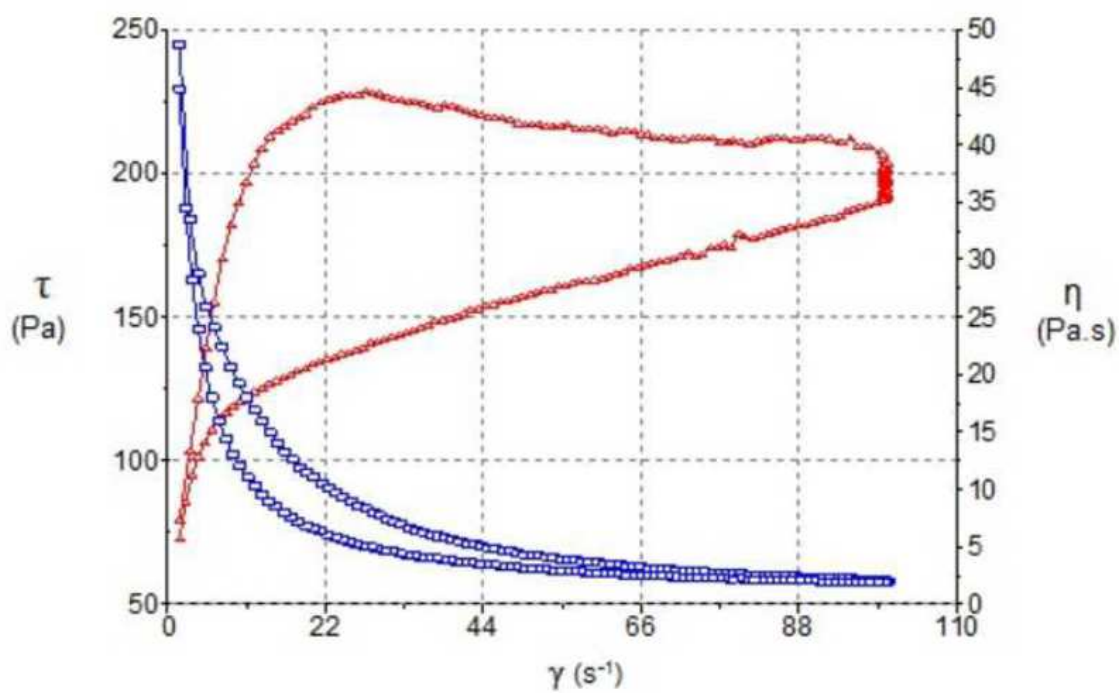
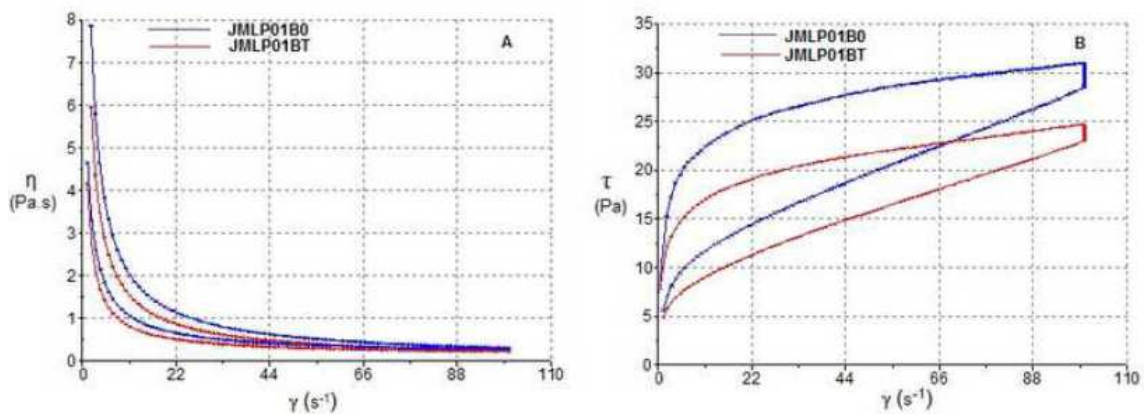
Fig. 8: Bifonazole cumulative permeated amounts (mean values and standard deviations) for JMLP01B0 (triangles down, hyphens), JMLP01BT (triangles up, dot line) and the commercial formulation, BFZ-CF (void squares, solid line).

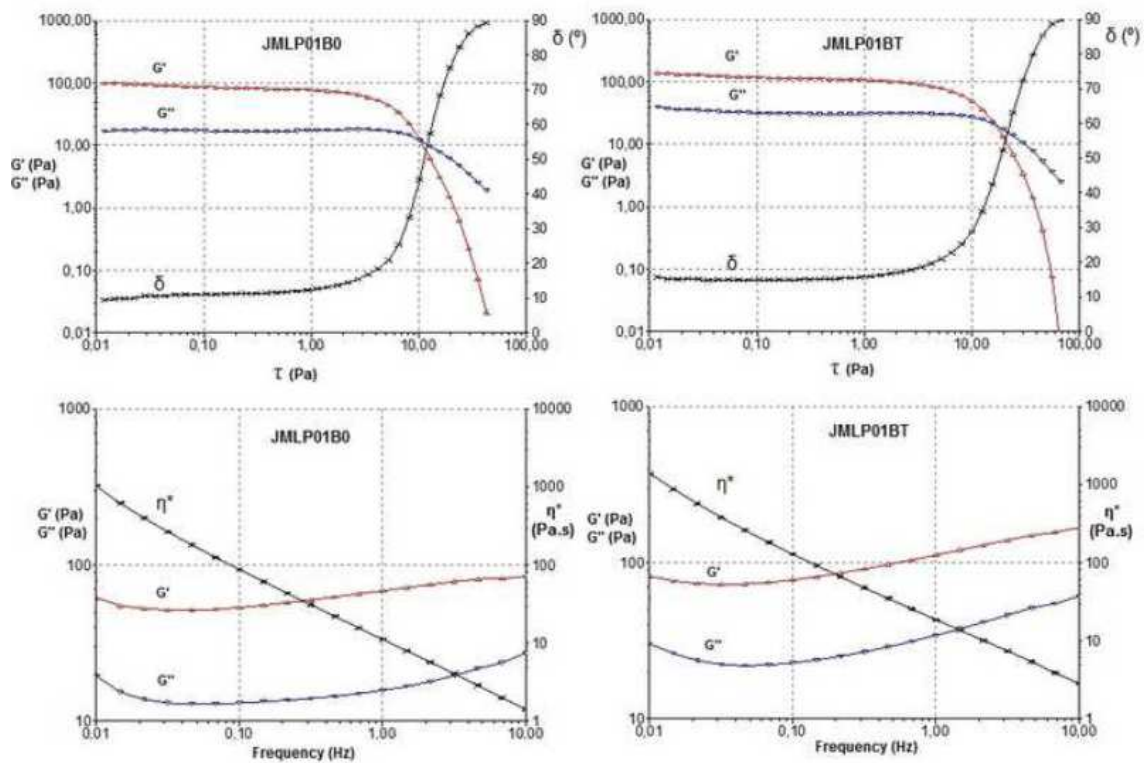
Fig. 9: Corneum Stratum Hydration (SCH) at  $t_0$  (a), Corneum Stratum Hydration (SCH) at  $t_1$  (b), Transepidermal Water Loss (TEWL) at  $t_0$  (c) and Transepidermal Water Loss (TEWL) at  $t_1$  (d).

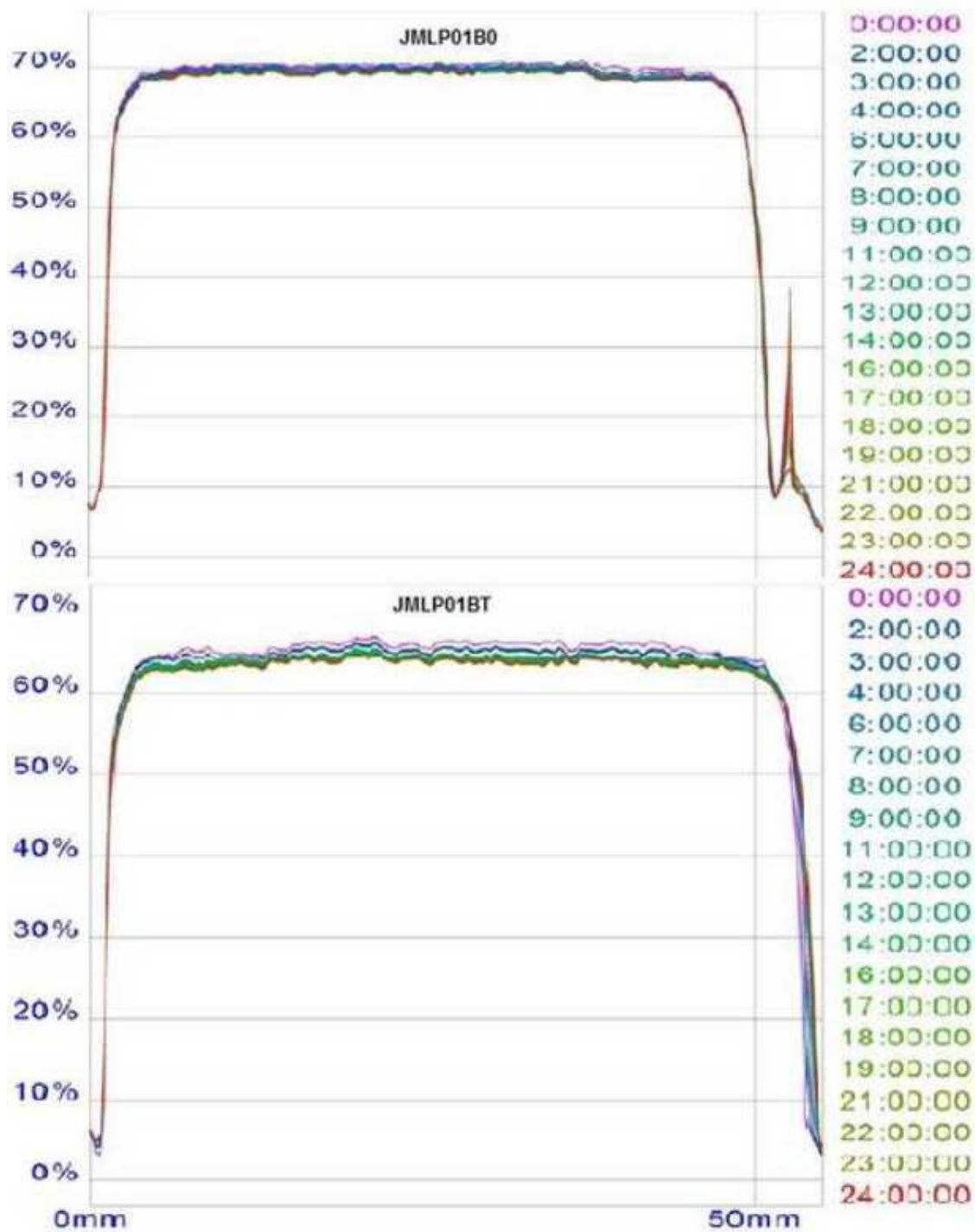


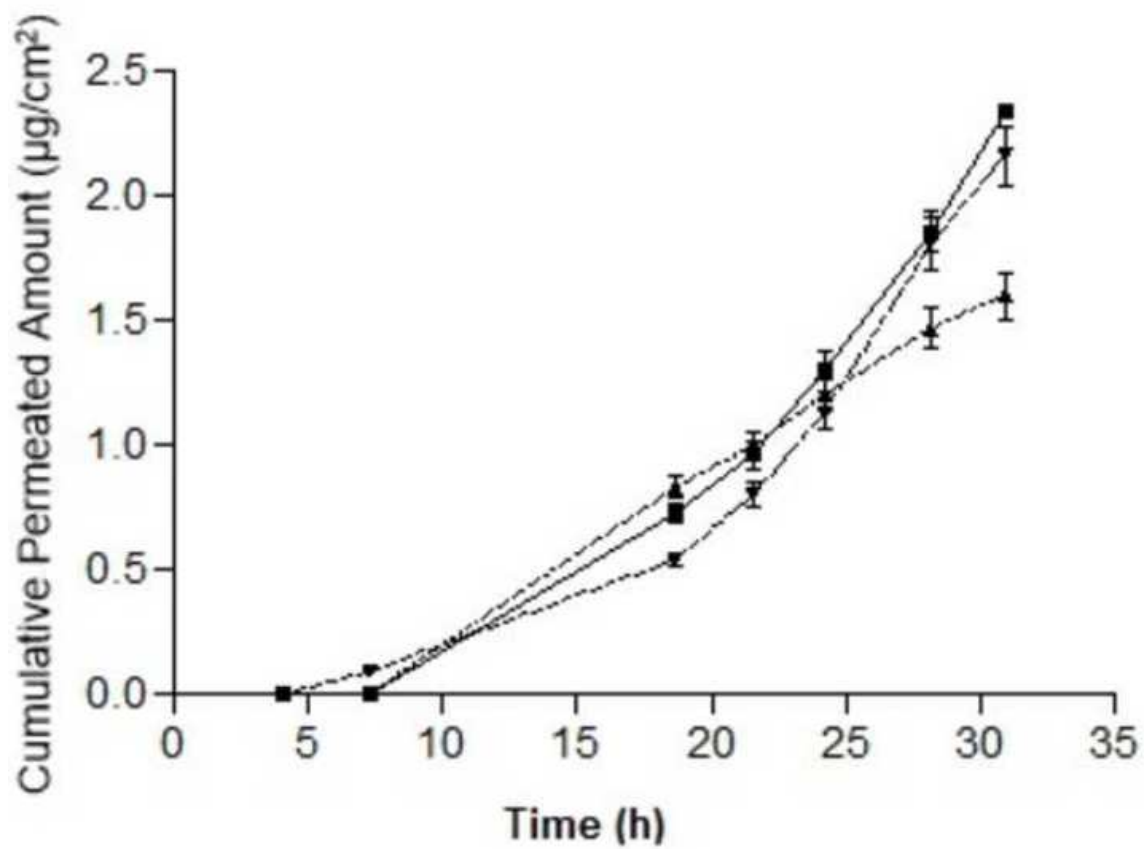
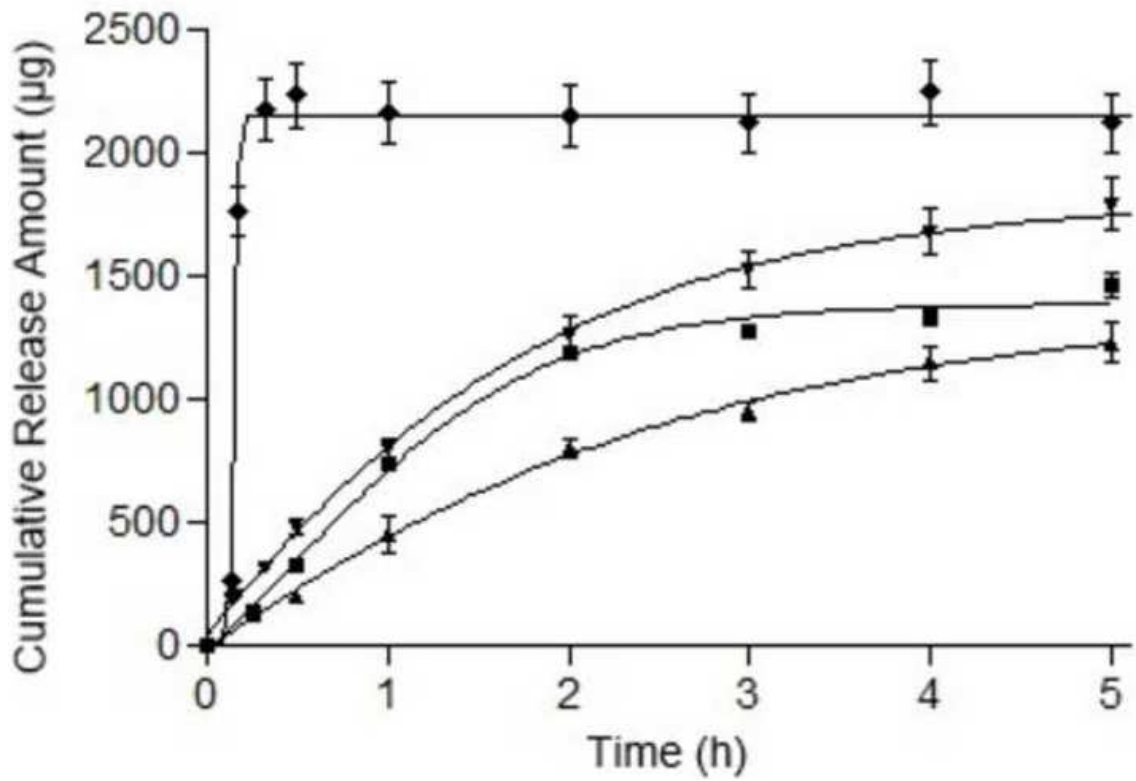


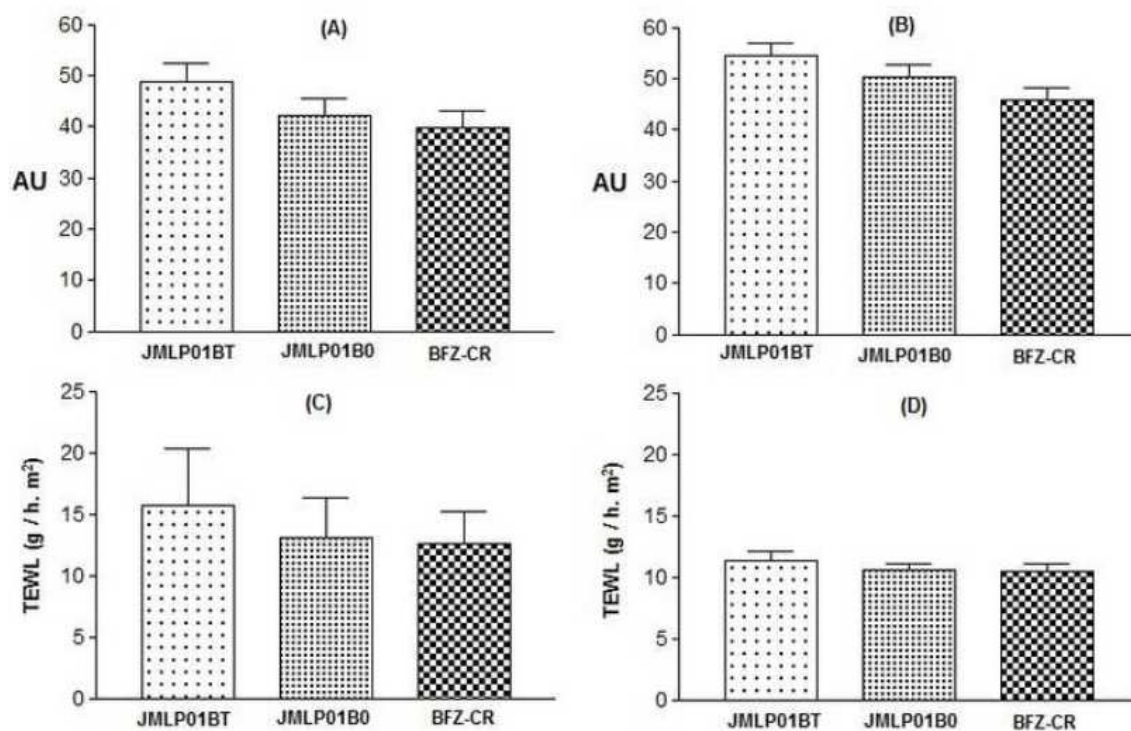












## CAPITOL IV. DISCUSSIÓ

---





## 4.1 DISCUSSIÓ

El tractament tòpic de les infeccions fúngiques cutànies es prefereix sobre el tractament oral, per evitar els efectes sistèmics adversos, per l'alliberament del fàrmac al lloc de la infecció i per l'alt compliment terapèutic. D'altra banda, s'han de proporcionar concentracions de fàrmac adequades en les capes diana de la pell per assegurar l'eficàcia del tractament tòpic. Per tant, l'alliberament de fàrmacs antifúngics per apuntar la regió de la pell és un gran repte en termes de terapèutica. En aquest context, la formulació del producte tòpic juga un paper clau per a la penetració dels fàrmacs. A més, les propietats fisicoquímiques de les molècules de fàrmac com ara lipofília són també el paràmetre eficaç. La lipofília és una característica de certs antifúngics (azols, alilamines, etc...) especialment important perquè afavoreix la penetració del fàrmac en l'estrat corni de la pell, la seva dispersió, la creació d'un efecte reservori a concentracions inhibidores en aquesta capa i els converteix en fàrmacs particularment indicats per al tractament tòpic de diverses patologies d'origen fúngic (*Puig i cols., 2008*). *Bennet* (2011) assenyala que apart del tipus de lesió i el mecanisme d'acció del fàrmac, la viscositat juntament amb les característiques hidròfobes del principi actiu i el pH de la formulació són paràmetres a tenir en compte alhora de valorar la eficàcia d'un preparat antifúngic d'aplicació tòpica.

Diverses noves formulacions galèniques han aparegut en la literatura científica actual en els últims anys per optimitzar els nous vehicles d'administració de fàrmacs antifúngics, i algunes dades que falten però, en certa mesura, s'han publicat (veure 1.1.4).

A continuació es procedeix a l'apartat de discussió sobre cada un dels articles publicats en l' apartat de resultats:

### ARTICLE I<sup>27</sup>

**“DEVELOPMENT OF CLOTRIMAZOLE MULTIPLE W/O/W EMULSIONS AS VEHICLES FOR DRUG DELIVERY: EFFECTS OF ADDITIVES ON EMULSION STABILITY”.**

**“Desenvolupament d'emulsions múltiples de clotrimazol com a vehicles per l'alliberament de fàrmacs: Efectes dels excipients en la estabilitat de les emulsions”.**

Els factors primaris que afecten la formació d'emulsions múltiples són la naturalesa química dels components, la concentració dels tensioactius utilitzats en les dues etapes

---

<sup>27</sup> Les Taules i Figures descrites en aquest apartat fan referència a elements que estan en la publicació detallada en el apartat de resultats.

d'emulsificació, la fracció de volum de l'emulsió primària i les condicions de barreja (*Florence i cols., 1982*).

Per tal de millorar la formació i estabilitat de les emulsions múltiples, el treball experimental dut a terme en aquesta publicació, es basa en l'estudi de la influència de: l'addició de concentracions variables d'estearat de sorbità (2-4%), de la naturalesa de la fase oliosa (triglicèrids de cadena mitja (LP); oli de yoyoba (YB); i miristat d'isopropil (IM) en l'emulsió primària i, finalment, la influència de la presència o no de polisorbat 80, co-emulsionant en la fase aquosa externa.

La selecció de la fase oliosa s'ha dut a terme amb estudis preliminars d'acord amb la formació de l'emulsió primària W/O i la solubilització del CLT. Es parteix de diferents tipus d'olis com per exemple, oli de parafina, oli de ricí, oli d'ametlles dolces i oli de germen de blat, però es descarten per la seva baixa capacitat de dissolució del CLT i la inestabilitat del sistema obtingut. Segons la literatura científica la naturalesa dels olis seleccionats (LP, YB i IM) són ben tolerats per la pell. En aquesta línia, en estudis preliminars s'aconsegueixen mostren resultats òptims per a concentracions de tensioactiu polimèric d'1 a 1,5% (p/p) i fase oliosa entre 12 i 18% (p/p).

La temperatura requerida en la formació de l'emulsió primària ha de ser controlada; en el nostre cas, es requereix 80 °C per tal d'obtenir el punt de fusió de la fase oliosa. Diversos treballs informen de la necessitat d'estabilització de l'emulsió primària W/O enfront la floculació i la coalescència (*Schmidts i cols., 2010*). L'augment de la pressió osmòtica d'electròlits a l'interior de les gotetes contraresta la pressió de *Laplace* responsable dels processos de maduració d'*Ostwald* per l'augment de la hidrofobicitat en la fase dispersa (*Jiang i cols., 2013*). Per aquesta raó, l'electròlit NaCl s'incorpora en una concentració de 0,25% (p/p). Aquesta concentració és prou alta per tal de compensar la pressió de *Laplace*, però, al mateix temps, prou baixa per tal d'inhibir la pressió osmòtica de les gotetes internes d'aigua (*Muschiolik i cols., 2007*).

D'altra banda, els emulsionants polimèrics són molt adequats per augmentar l'estabilitat, a llarg termini, d'emulsions en combinació amb emulsionants de baix pes molecular. L'emulgent polimèric utilitzat en aquest treball és la cetildimeticona copoliol (CDC), un emulsionant polimèric ideal, de naturalesa silicònica, de baix HLB per a l'obtenció de l'emulsió W/O primària inicial, que es pot emulsionar en una fase aquosa externa gelificada que conté l'emulsionant hidròfil amb molt bones propietats d'estabilització (*Olivieri, 2003*). A més, s'afegeixen dos altres co-tensioactius diferents, estearat de sorbità amb HLB 4,7 i polisorbat 80 amb HLB 15. El tensioactiu no-iònic de baix HLB és predominantment hidròfob i s'afegeix a la fase oliosa. L'agent tensioactiu no iònic d'alt HLB és predominantment hidròfil i s'afegeix a la fase aquosa contínua externa. La relació de concentració d'aquests dos co-tensioactius és també important per a l'estabilitat i el rendiment de les emulsions múltiples

W/O/W (*Florence i cols., 1982*). Per aquesta raó, també s'avalua la incidència en l'estabilitat de diferents quantitats d'aquests excipients tal com s'ha esmentat anteriorment, així com de la fase oliosa que ofereix una major estabilitat.

D'acord amb les imatges de microscopia òptica, les emulsions múltiples W/O/W obtingudes poden considerar-se com de tipus C segons *Florence i cols (1982)*. Els autors descriuen emulsions del tipus C, en forma d'emulsions composades de gotes grans que presenten gran nombre de gotes al seu interior. Aquesta anàlisi també confirma el menor rendiment de les emulsions múltiples amb IM en comparació amb LP i YB. De fet, els sistemes JMIM03 i JMIM03T no es formen completament després de la seva elaboració i per tant es descarten segons es pot observar en la Taula 1 de la publicació.

Els valors de pH han mostrat una bona compatibilitat per a l'administració tòpica dels preparats. L'anàlisi conductimètrica s'ha dut a terme per tal de mesurar l'atrapament de l'electròlit a l'interior de la fase aquosa de l'emulsió primària i detectar qualsevol fuga de l'electròlit a la fase aquosa externa. Quan no hi ha migració d'electròlits de la fase interna, el sistema d'emulsió múltiple pot ser descrit com a estable. Un augment en la conductivitat implica una migració dels electròlits (*Tedajo i cols., 2001*). Pot ocórrer com a resultat de difusió o pel trencament de les gotetes. Diferents autors descriuen que, un gran augment de la pressió osmòtica per NaCl pot causar la destrucció de la membrana d'oli i per tant una inversió de fases (*Tang i cols., 2012*).

En les sèries d'emulsions múltiples preparades, s'observa que si s'incrementa la concentració d'estearat de sorbità en la fase interna des de 2 fins a 4% augmenta la mida de les gotes múltiples W/O/W (per exemple, JMLP01  $40,39 \pm 0,3$  micres; JMLP03  $134,14 \pm 3,1$  micres a les 24 h de preparació). Fet que pot ser atribuït a la major acumulació d'agent tensioactiu en la interfase, i per tant que resulta en una pel·lícula interfacial més gruixuda i que fa augmentar la mida de les gotetes (*Geiger i cols., 1998*). Aquest augment també s'observa en els valors de viscositat. D'altra banda, cal remarcar que l'addició de polisorbat 80 com estabilitzador en el polímer d'àcid acrílic gelificant de la fase externa provoca una disminució significativa de la mida de les gotetes d'oli en comparació amb els preparats sense polisorbat (per exemple, JMLP01  $40,4 \pm 0,3$  m; 31,2 JMLP01T  $\pm 0,2$  micres, a les 24 h de preparació). Aquestes característiques s'observen en totes les mostres durant els 180 dies d'emmagatzematge (per exemple, JMLP01  $40,4 \pm 0,3$  micres, amb 24 h; JMLP01  $38,2 \pm 0,1$  a 180 dies). La incorporació de CLT en les emulsions múltiples dona com a resultat un augment de la mida de gota en comparació amb l'emulsió múltiple sense CLT (per exemple, JMLP01 amb CLT  $40,4 \pm 0,3$  micres; JMLP01 sense CLT  $30,2 \pm 0,2$  micres). L'augment de mida de gota després de la incorporació de fàrmacs és un fenomen general observat en diversos medicaments (*Souto i cols., 2004*). L'heterogeneïtat en la distribució de la mida de les gotes s'ha evidenciat en el següent ordre JMLP>JMYB>JMIM i podria estar relacionat

amb el HLB requerit per ser emulsionada l'emulsió primària (LP<YB<IM: 1; 6,5; 11,5 valors HLB respectivament).

La comprensió de la reologia de les emulsions múltiples W/O/W és un factor important tant per a l'elaboració com per l'estabilitat física (Pal, 2011). També pot proporcionar informació útil sobre l'estructura de les emulsions múltiples i l'alliberament dels fàrmacs (Krishnaiah i cols., 2014). Els resultats de l'anàlisi reològica rotacional han mostrat primer que les emulsions múltiples assajades depenien de la velocitat de cisalla (Fig. 3). Totes les formulacions exhibeixen un flux pseudoplàstic no-newtonià i un comportament reofluidificant i tixòtròpic mostrant una disminució constant en la viscositat amb l'augment de velocitat de cisalla de 0 a 100 s<sup>-1</sup>. El comportament tixotròpic ha demostrat una alteració de la microestructura de l'emulsió múltiple W/O/W sota l'efecte de la velocitat de cisalla. En aquest cas, la força de cisalla indueix canvis estructurals irreversibles que podrien ser interpretats com una ruptura de les gotes múltiples, sense inversió, que produeix una disminució de la fracció del volum i en conseqüència una disminució de la viscositat. També podria succeir una inversió de fase a W/O produint una substitució d'una fase més viscosa per la fase externa i per tant un augment dels valors de la viscositat (Kawashima, 1991). No obstant això, en relació amb l'administració tòpica, la tixotropia és una propietat desitjada perquè contribueix a augmentar el temps de retenció de la formulació al lloc d'aplicació (Silva i cols., 2012). Els models matemàtics que millor s'ajusten a les dades experimentals obtingudes són l'equació de Cross que proporciona un model general per a materials pseudoplàstics i Herschel-Bulkley que és una model de tres paràmetres que s'utilitza per descriure els materials viscoplàstics. Respecte a les mesures de viscositat, la naturalesa de l'oli és important en les propietats finals de les emulsions múltiples W/O/W (Florence i cols., 1982). Es creu que la viscositat de la fase oliosa té un efecte dominant sobre les característiques fisicoquímiques de les emulsions múltiples. En aquesta línia, la sèrie JMYB inclou les mostres amb valors més alts de viscositat, després la sèrie JMLP i per últim la sèrie JMIM que són les mostres menys viscoses a 10 s<sup>-1</sup>.

Les emulsions primàries presenten un flux no-newtonià, i la viscositat disminueix amb un augment de la força de cisalla de 0 a 100 s<sup>-1</sup> que recolza els resultats obtinguts en l'emulsió múltiple W/O/W final. S'ha observat en la sèrie JMYB que a l'augmentar la concentració d'estearat de sorbità (2, 3, i 4 %; JMYB01, JMYB02, i JMYB03 respectivament), els valors de viscositat augmenten (veure full suplementari 2). Una tendència similar s'exhibeix a la sèrie JMIM però no en la sèrie JMLP. D'altra banda, com mostra la Fig. 4b, l'addició de polisorbato 80 provoca una disminució de la viscositat de la fase aquosa externa. Aquest fet també s'observa en l'emulsió múltiple final. L'addició d'1% de polisorbato 80 va donar lloc a una disminució de la viscositat en totes les mostres excepte JMLP02. Aquesta tendència podria estar relacionada amb la petita mida de les gotes (El-Hadidy i cols., 2012). Les corbes de flux i viscositat de les emulsions W/O/W (Fig. 3) mostren no només el seu comportament

pseudoplàstic acompanyat d'una tixotropia poc aparent, sinó també la seva estabilitat acceptable sota l'esforç de cisalla que no ha fet canvis irreversibles dràstics en la seva estructura (les corbes ascendents i descendents no són massa separades), que és un avantatge per a l'aplicació de la pell a causa de l'efecte reofluidificant de la cisalla. D'altra banda, els valors de viscositat més alts per JMYB01 i JMLP01 en comparació amb els altres sota estudi són un benefici per a l'estabilitat física del sistema durant l'emmagatzematge (Schramm, 1994).

Els estudis reològics oscil·latoris d'estrès d'escombrat d'esforç de cisalla i escombrat de freqüència s'han utilitzat per avaluar la regió viscoelàstica lineal (LVR), la viscositat complexa ( $\eta^*$ ), el mòdul d'emmagatzematge ( $G'$ ) i el mòdul de pèrdua ( $G''$ ), que proporcionen una caracterització quantitativa de l'equilibri entre les propietats viscoses i elàstiques de les emulsions múltiples. El punt final de la LVR (regió viscoelàstica lineal) s'ha determinat com una tensió crítica quan el valor de  $G'$  es redueix un 10% a partir del nivell lineal. La tensió crítica s'ha trobat a 2 Pa aproximadament per a totes les formulacions estudiades. D'acord amb els resultats, un esforç de cisalla constant de 1 Pa (50% del valor crític) s'ha seleccionat per a realitzar la prova d'escombrat de freqüència (Fig. 7). Aquestes proves han revelat la prevalença del comportament elàstic sobre el viscos ( $G' > G''$ ). Aquest efecte és conegut com "elastic plateau".  $G'$  és un indicador del comportament elàstic i revela la capacitat del sistema per l'emmagatzematge d'energia elàstica associada amb una deformació elàstica recuperable.  $G''$  és una mesura del comportament de la viscositat dinàmica que fa referència a la dissipació d'energia associada amb una viscositat perduda irrecuperable. S'ha observat també que el valor de  $G'$  augmenta en la majoria dels casos quan la concentració d'estearat de sorbità va augmentant (2, 3, i 4%), que també s'acompanya d'un augment en la mida mitjana de gota. En aquest sentit l'augment de l'elasticitat amb l'increment de tensioactiu també ha estat descrit per alguns autors (Korhonen i cols., 2002). No obstant això, la incorporació de polisorbitat 80 disminueix dramàticament el comportament elàstic i la mida de gota. Observant els valors de  $\eta^*$  obtinguts, els estudis oscil·latoris donen suport als estudis rotacionals. Els valors més alts de viscositat es van observar en la sèrie JMYB a  $0,10 \text{ s}^{-1}$ . Els tests oscil·latoris també mostren que les emulsions múltiples presenten les propietats viscoelàstiques amb component predominantment elàstic (Fig. 5 i 7). L'exhibició de la zona de gran "plateau" evidència l'existència d'una estructura que promou l'estabilitat física del sistema a causa de la seva característica elàstica. En aquest sentit, cal destacar JMYB01 com a sistema que presenta valors més alts no només per  $G'$ , sinó també per  $G''$  i  $\eta^*$  (Fig. 7).

La desestabilització física es mesura usant un analitzador òptic tipus Turbiscan<sup>®</sup> que permet en temps real la informació sobre la cinètica del procés que condueix a la separació de fases. Podria ser també possible discriminar entre la migració de gotetes (cremat, sedimentació) i la variació de mida de les gotetes (coalescència, floculació). La Figura 8 mostra els perfils

de BS de JMLP03, JMYB02, i JMIM01T. El costat esquerre de la corba correspon a la part inferior del vial, mentre que el costat de la dreta correspon al comportament de la mostra a la part superior del vial. En les gràfiques es pot observar que hi ha senyals constants (superposició) sense variacions significatives. Els pics a la part superior i al fons del vial corresponen amb el contacte del final de la mostra amb el vidre. A més, la inestabilitat es defineix ja sigui per una pèrdua de viscositat, una separació de fases, o una inversió de fase. En general, observant les mostres per microscopia òptica es mantenen invariables durant tot el període d'emmagatzematge (temperatura ambient) indicant l'absència exterior i interior de separació de fases o inversió.

Com es pot observar en el full suplementari 4, entre les sèries JMYB, els valors de viscositat augmenten lleugerament amb el temps excepte JMYB01 i JMYB02 causa de la desestabilització inicial confirmada per estudis d'estabilitat tèrmica a 40 °C. Un lleu augment també s'observa entre les sèries JMLP, excepte JMLP01 que mostra una petita disminució dels valors de viscositat. Finalment, la sèrie JMIM comporta de manera similar entre elles un lleuger augment, uniforme, en els valors de viscositat amb el temps. Els canvis en la viscositat de les emulsions múltiples en el temps depèn de la difusió des de la fase aquosa interna a la fase contínua exterior, o viceversa. D'aquesta manera, la difusió d'aigua de la fase aquosa contínua en la fase aquosa interna comporta un augment de la viscositat. El procés contrari suposa una disminució de la viscositat. Aquest pas de l'aigua d'una manera o altre és impulsat per diferències de pressió osmòtica (*Wen i cols., 2001*). Finalment tal com s'esperava, la temperatura ha tingut una influència important en l'estabilitat d'aquests sistemes. La sèrie JMLP són les formulacions més estables contra les condicions de temperatura perquè totes les formulacions són estables després de 180 dies a 30 °C, encara que a 40 °C els resultats són similars als obtinguts amb la sèrie JMYB.

En conclusió, aquest estudi demostra que l'estabilitat de les emulsions múltiples W/O/W és altament dependent de la composició. Com a regla general, s'han aconseguit les formulacions més estables utilitzant LP i pot ser estabilitzada per una combinació de tensioactius polimèrics i de co-emulgents de HLB baix. La formulació JMLP01 amb 1,5% de CDC, i un 2% estearat de sorbità i un 11% de LP és la formulació més estable a llarg termini, en la mida de gota més petita, òptimes característiques fisicoquímiques, el comportament de flux i alta eficiència d'encapsulació en diferents condicions d'emmagatzematge a 180 dies. Aquestes emulsions múltiples W/O/W són sistemes estables amb comportament reològic que podria ser una excel·lent alternativa a altres preparats del mercat farmacèutic per al tractament d'infeccions fúngiques de la pell. Les formulacions proposades podrien ser també utilitzades com a sistemes útils per a altres antifúngics imidazòlics. De fet, altres principis actius com econazol i bifonazol s'estudien com potencials candidats.

**ARTICLE II<sup>28</sup>****“SKIN PERMEATION OF ECONAZOLE NITRATE FORMULATED IN AN ENHANCED HYDROPHILIC MULTIPLE EMULSION”.****“Permeació en pell del nitrat d’econazol en una emulsió múltiple hidrofílica millorada”.**

La baixa solubilitat en aigua dels fàrmacs antifúngics azòlics fan de la seva administració tòpica un repte considerable. La seva alta lipofília implica que durant l’elaboració part del fàrmac ha de romandre en suspensió (*Raab, 1980*). Aquest fet limita el seu nivell de permeació i, per tant, la seva acumulació en el lloc d’acció desitjat. En aquest estudi que es presenta, les emulsions múltiples s’han investigat com una possible alternativa per millorar les propietats biofarmacèutiques del nitrat d’econazol enfront una crema anhidra comercial que consisteix en una dispersió de parafina líquida amb l’ajuda de diferents èsters grassos de Macrogol<sup>®</sup> (tensioactius i co-emulsionants). Les emulsions múltiples són un vehicle versàtil per vehicular, per exemple, fàrmacs hidròfils amb limitacions d’inestabilitat si s’administren per via oral. En aquest estudi, una emulsió múltiple d’ECN s’ha optimitzat dissolvent el fàrmac en la fase lipòfila d’aquesta formulació hidròfila. S’ha previst obtenir un nivell més alt de la permeació cutània i una retenció sobre la pell semblant a la formulació comercial i, alhora, millorar les característiques reològiques del producte.

Referent a les característiques de l’emulsió múltiple, els valors de pH de les dues fases aquoses pot influir en el perfil d’alliberament dels fàrmacs ionitzats. En el nostre cas, el punt isoelèctric de l’econazol (pH 6.6) ha estat seleccionat per a ambdues fases aquoses per optimitzar el seu alliberament i la seva polaritat segons el que suggereixen altres autors (*Nakhare i cols., 1995; Raab, 1980*). La sal de nitrat d’econazol és preferible enfront la base per la seva major solubilitat en aigua. De fet, la base d’ECN és pràcticament insoluble en aigua, encara que molt soluble en etanol. A l’inrevés, la forma catiònica, ECN, és molt poc soluble en aigua i poc soluble en etanol 96 ° (*Dyas i cols., 1994; Council of Europe, 2016*). En el nostre cas s’ha dissolt completament en la fase intermèdia lipòfila envoltada de les fases aquoses interna i externa ( $W_1$  i  $W_2$ ). Aquesta fase oliosa representa només el 15,5% del pes total i la seva composició ha estat optimitzada en estudis previs (*Suñer i cols., 2014*). Diferents olis clàssics (per exemple, oli de parafina, oli de ricí, oli d’ametlles dolces, oli de germen de blat, ...) s’han assajat i s’han descartat a causa de la seva pobra estabilitat i capacitat de solubilització (*Suñer i cols., 2017a*). Alternativament, s’han escollit Labraphac<sup>®</sup> Liphofile WL 1349 (Triglicèrids de cadena mitja), juntament amb Transcutol<sup>®</sup> P (dietilenglicol

---

<sup>28</sup> Les Taules i Figures descrites en aquest apartat fan referència a elements que estan en la publicació detallada en el apartat de resultats.



monoetil èter), que són bons dissolvents per actius lipòfils associats amb promotors per a la penetració de fàrmacs (Gattefossé, 2016).

Segons les característiques de l'emulsió múltiple, aquesta s'ha classificat segons Florence i Whitehill (1982) com tipus C. A nivell de contingut de fàrmac (ca. 85%) i mida de gota, els resultats obtinguts són comparables als obtinguts per altres autors amb vehicles i/o formulacions com són els etosomes d'ECN dispersats en promotors que contenen gels (Verma i cols., 2012; Keshri i cols., 2012).

Quant a la estabilitat a llarg termini de les emulsions múltiples, les característiques organolèptiques i els valors de pH s'han mantingut gairebé constant en el temps, el que suggereix un bon manteniment de les característiques organolèptiques. Les observacions per microscopia òptica revelen la presència de moltes gotes petites dins de la fase interna confirmant l'estructura múltiple. Els possibles canvis en la distribució de mida de gota han estat investigats utilitzant la tecnologia per difracció làser (LD) (Malvern Instruments, 2007). Les mesures efectuades en el moment inicial i al final de l'estabilitat s'han considerat acceptables perquè el valor residual ponderat ha estat en tots els casos menor de l'1%. Els valors més alts del residual ponderat indiquen un ús incorrecte en els valors d'índex de refracció i d'absorció de la mostra i el dispersant (Malvern Instruments, 2007). És sabut que aquesta tècnica làser detecta la distribució de la mida de gotetes de la fase externa, però no la distribució de la mida de les gotetes de la fase interna. Com a resultat, la fracció de volum dispers s'estima com a una emulsió simple (Dickinson, 1991). Tenint en compte que ECN es dissol en la fase oliosa, és a dir, la fase contínua de la goteta, aquesta simplificació s'accepta de manera fiable com a indicador de l'estabilitat.

Tenint en compte  $D[v,0,9]$ , el 90% de les gotetes de la W/O de la ME estan per sota de 319  $\mu\text{m}$  i 53  $\mu\text{m}$  aproximadament per a la formulació comercial. També cal destacar que la distribució de la mida de partícula de la formulació comercial és clarament bimodal. Com es mostra a la Figura 2B, el pic de major grandària de partícula es pot atribuir a la mida de gota de l'emulsió i la mida més petita pot ser degut a cristalls de fàrmac en suspensió com es confirma per observacions microscòpiques amb llum polaritzada. No s'han trobat variacions estadísticament significatives del paràmetre de mida de les gotetes ( $\alpha=0,05$ ).

L'estudi d'estabilitat utilitzant l'anàlisi òptica mitjançant el dispositiu tipus Turbiscan® detecta la desestabilització per fenòmens relacionats amb la separació de fases, com els fenòmens de cremat i sedimentació reversibles per mitjans mecànics d'agitació, i variacions en la mitjana de mida de gota com són la coalescència i floculació, generalment irreversibles (Mengual, 1999). A causa de l'opacitat de les mostres, només mesura el BS ("Backscattering"), útil davant de la presència de sistemes opacs i concentrats (Lemarchand i cols., 2003). Els resultats dels perfils de BS durant les mesures a 24 h han estat inferiors al 10% per la alçada total dels tubs de mesura. Això significa que no hi ha variació significativa

de la mida de partícula sota les condicions d'anàlisi durant la mesura inicial a les 24 h de preparació i/o durant la fi de l'estudi d'estabilitat als 6 mesos. Sobre la base d'aquesta tecnologia anomenada dispersió de la llum múltiple ("*multiple light scattering*"), el dispositiu permet detectar petits canvis en els perfils de BS abans de l'aparició d'una modificació física a escala macroscòpica, i per tant es pot afirmar que l'estabilitat de la ME és més gran que la durada de l'estudi d'estabilitat (*Celia i cols., 2009*).

La influència de les característiques reològiques sobre la permeació i les propietats del vehicle resultant s'han estudiat també com un indicador d'estabilitat (*Grossiord i cols., 1998*). Alguns autors (*El-Badry i cols., 2014*) han trobat una relació recíproca entre la viscositat i l'alliberament del fàrmac a causa d'una reducció dels nivells de difusió (*Pal, 1996*). *Bennet* (2011) assenyala que la viscositat juntament amb les característiques hidròfobes del principi actiu i el pH de la formulació són paràmetres a tenir en compte alhora de valorar la eficàcia d'un preparat antifúngic d'aplicació tòpica. En aquest sentit s'han realitzat els estudis reològics rotacionals, i els estudis oscil·latoris d'estrès d'escombrat d'esforç de cisalla i els estudis d'estrès d'escombrat de freqüència. Com es mostra en Fig. 3a i 3b, la viscositat disminueix amb un augment de la velocitat de cisallament de 0 a 100 s<sup>-1</sup>. Els perfils reològics demostren un marcat flux no-newtonià pseudoplàstic amb una lleugera tixotropia, un comportament reofluidificant, propietat desitjable per a una preparació tòpica semisòlida (*Pena i cols., 1994*). En el cas de les emulsions múltiples, la cisalla indueix canvis estructurals irreversibles, que podrien explicar-se com un trencament de les gotetes múltiples sense inversió produint una disminució de la fracció de volum i en conseqüència una disminució dels valors de viscositat (*Kawashima i cols., 1991*). Aquest efecte en la ruptura implica una disminució en la mida de gota facilitant així una permeació del principi actiu. De fet, també és conegut una relació inversa entre la mida de les partícules i l'oclusió, s'explica com un efecte de recobriment que per tant facilita la penetració del fàrmac (*Keshri i cols., 2012*). Pel que fa a la formulació comercial (Fig. 3B), els valors de viscositat també disminueixen ràpidament amb la velocitat de cisalla, mostrant un major efecte tixotròpic sense trencament de gotes aparent.

Els estudis reològics oscil·latoris d'estrès d'escombrat d'esforç de cisalla i escombrat de freqüència s'han utilitzat per avaluar la regió viscoelàstica lineal (LVR), la viscositat complexa ( $\eta^*$ ), el mòdul d'emmagatzematge ( $G'$ ) i el mòdul de pèrdua ( $G''$ ), que proporcionen una caracterització quantitativa de l'equilibri entre les propietats viscoses i les elàstiques de les emulsions múltiples.  $G'$  indica la capacitat del sistema per emmagatzemar energia elàstica recuperable. Altrament,  $G''$  mesura la propietat viscosa dinàmica relacionat amb la dissipació d'energia associada de la viscositat perduda irrecuperable. Com es mostra en les Fig. 4-5, totes les formulacions van revelar una prevalença del comportament elàstic sobre el comportament viscos ( $G' > G''$ ). Aquest efecte conegut com "elastic plateau" dona suport a l'estabilitat física del sistema i la seva resistència a les forces externes durant llargs períodes

de temps (*Korhonen, 2000*) afavorint l'extensibilitat del producte en la superfície de la pell. Els models de fluxos obtinguts han donat lloc a l'ajustament matemàtic segons el model matemàtic de *Cross (1965)*, model que ha resultat ser el millor descriptor de la viscositat per ambdues formulacions. Altres models com *Bingham, Ostwald de Waele, Herschel-Bulkley* i *Casson* han demostrat ser menys descriptius que el model de *Cross*. Està majoritàriament establert que la penetració de fàrmacs per via tòpica està clarament relacionada amb el tipus de vehicle (*Daniels, 2007; Nielsen i cols., 1984*). Quan un fàrmac lipòfil s'aplica sobre la pell, s'acumula a la capa exterior, l'estrat corni (SCR), que pot alliberar el fàrmac lentament a les capes subjacents de la pell en funció de la variabilitat interindividual de la pell. Una formulació W/O per a un fàrmac lipofílic causa una oclusivitat típica en la superfície de la pell, que és un medi ambient adequat per al creixement de fongs a la temperatura corporal. Al revés, la formulació W/O/W més hidròfila i menys oclusiva implica una millor protecció física contra el creixement de fongs juntament amb una aplicació agradable i refrescant comparable als obtinguts amb emulsions simples tipus O/W. De fet, les emulsions múltiples proporcionen una alta extensibilitat com el resultat del seu flux pseudoplàstic i la seva consistència final pot ser modulada amb l'addició de excipients viscositzants, com ara carbomer, a la fase aquosa externa. Aquest polímer reticulat, derivat del àcid acrílic, afavoreix el comportament reofluidificant durant l'aplicació i estabilitza la interfase millorant la estabilitat al llarg del temps. A més amb aquest efecte sobre la viscositat, la permanència de la formulació en la pell o mucosa pot ser millorada gràcies a les seves propietats mucoadhesives (*Lubrizol Corporation, 2011; Johal i cols., 2016*) i també a la tixotropia favorable de la formulació, i promovent l'alliberació del fàrmac (*Silva i cols., 2012*).

El test EUCAST d'activitat antifúngica es basa en el càlcul de la concentració de ECN més baixa (MIC) que inhibeix el creixement de cada espècie de fong. Aquesta prova de fàcil realització, ràpida i econòmica, és un mètode molt utilitzat per comprovar la susceptibilitat dels llevats fermentadors de glucosa que causen infeccions clínicament significatives (principalment *Candida spp.*) (*Rodríguez i cols., 2008*). Els resultats mostren que són diferents per a cada microorganisme, i són més eficaces contra la *Candida albicans* (2 mg/ml) que per als altres. S'ha observat certa influència de l'opalescència de les formulacions, especialment en el cas de *Candida albicans* i *Candida parapsilosis*, la solució de fàrmac en DMSO ha resultat ser més eficaç que les formulacions. En tots els casos no s'han observat diferències de *Candida glabrata*, amb el valor més alt de MIC (78 mg/ml). Els resultats equivalents respecte a *C. glabrata* (solució i cremes) poden ser probablement a causa de la seva menor sensibilitat a econazol en comparació amb *C. albicans* i *C. parapsilosis*. També passa amb altres antifúngics imidazòlics com ara isoconazol, que amb *C. glabrata* exhibeix també el més alt valor MIC del grup (*Veraldi, 2013*). Per tant, a majors concentracions, l'efecte de opalescència de la mostra no seria rellevant.

Altrament, les dues formulacions s'han mostrat igualment eficaces contra totes les soques, probablement pel perfil d'alliberació ràpid amb presència de quantitats massives de fàrmac.

Pel que fa a les condicions experimentals de l'estudi d'alliberament i permeació, les condicions "SINK" estan garantides en el compartiment receptor de tots dos experiments. S'ha seleccionat una membrana d'alliberament basat en la permeabilitat del ECN. Com a resultat, el material més lipòfil (Nylon) va resultar ser el més adequat. El porus de malla de la membrana és clarament inferior a les mides de gota. Per tant, es pot assegurar que els perfils són atribuïbles a la fracció de fàrmac alliberat a partir de les gotetes. Les quantificacions per espectrofotometria UV-Vis i HPLC han estat validades prèviament amb uns bons resultat per a la linealitat, precisió, exactitud i la recuperació.

Els perfils d'alliberament han aconseguit valors asimptòtics després de 5 h en les dues formulacions (69% i 64% de contingut de fàrmac real de ME i crema). Els perfils cinètics individuals de les emulsions múltiples han estat descrits amb una equació de primer ordre, el que suggereix la difusió passiva del medicament dissolt en la formulació. En el cas de la formulació comercial, que probablement conté part de la dosi en suspensió, el millor ajust va ser l'equació hiperbòlica, un procés lleugerament més lent que el de l'equació de primer ordre. En tots els casos, l'equació d'ordre  $u$  (arrel quadrada), que s'utilitza habitualment per descriure els perfils d'alliberament dels fàrmacs sobresaturats, van donar un ajustat més pobre d'acord amb el valor d'AIC (Criteri d'*Akaike*) (*Yamaoka i cols, 1978*). En aquest cas va ser descartada una sobresaturació del fàrmac en les formulacions. Aquestes diferències entre les dues formulacions han impedit una comparació modelística. En lloc de les velocitats de penetració i extensions s'han comparat les quantitats alliberades  $Q_{24}$  i  $AUC_0^5$ . En termes generals, tot i que s'assoleixen nivells asimptòtics al mateix temps (5 h), el fàrmac s'allibera més ràpidament de la ME que de la formulació comercial. No obstant això, no s'han trobat diferències estadísticament significatives entre ambdues formulacions que han portat a considerar valors similars. En resum, a part de les diferències intrínseques de la distribució de mida de gota i de la reologia, ambdues formulacions poden ser considerades comparables en termes d'alliberament i eficàcia antimicrobiana *in vitro*.

En relació a la permeació, les mostres de pell s'han tallat en làmines de 400  $\mu\text{m}$  amb l'ajuda d'un dermatom incloent la totalitat de l'epidermis que és la part més profunda on es duu a terme l'acció del fàrmac. La retenció de fàrmac oscil·la entre 40 i 70 ppm, que són equivalents a 15,89 i 15,91  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  per a la crema comercial i la ME respectivament. Els resultats han estat estadísticament similars per a les dues formulacions ( $\alpha = 0,05$ ). Aquestes concentracions de fàrmac estan en el rang dels valors obtinguts *in vitro*, per exemple, 2 ppm per *Candida albicans* i 78 ppm per *Candida glabrata*. Aquest fet dóna suport a l'eficàcia *in vitro* d'ECN de les dues formulacions. Altres autors amb micel·les polimèriques amb ECN i mitjançant pell de l'orella de porc han obtingut valors comparables com 22,8  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  que va

penetrar a través dels fol·licles pilosos (*Bachhav i cols., 2011*) i valors més alts amb pell de rata, 42,8 µg/cm<sup>2</sup> (*Quatresooz i cols., 2008, Ge i cols., 2014*), que és més permeable que la pell humana.

L'acumulació d'antifúngics imidazòlics en SCR sembla ser causa d'una unió reversible a la queratina (*Hashiguchi i cols., 1998*) que és directament proporcional a lipofília del principi actiu i al contingut d'aigua en pell (*Ge i cols., 2014*). Es coneix que la retenció de la pell es produeix no només en SCR, sinó també en epidermis i dermis a causa de diferents factors (*Tauber i cols., 1979*).

L'emulsió múltiple revela una permeació d'ECN estadísticament major que la formulació comercial (11,64 vs 1,88 µg/cm<sup>2</sup> en 24 h) basat en un test d'ANOVA. El flux de fàrmac de la ME (0,696 µg/cm<sup>2</sup>/h) va ser × 3 més alt que els valors obtinguts per a la formulació comercial (0,243 µg/cm<sup>2</sup>/h), però sense diferències estadístiques significatives. Altres autors (*Ge i cols., 2014*) han trobat nivells alts de penetració de la ECN amb pell de rates usant una microemulsió, per exemple, 20,71 µg/cm<sup>2</sup> en 12 h i valors de flux similars, per exemple, 0,46 µg/cm<sup>2</sup>/h. En el nostre cas, aquesta major permeació de la pell per la ME es pot atribuir a la presència d'excipients solubilitzants en la fase intermèdia, capaços de dissoldre el fàrmac, un 15% del pes total de la formulació. Sobre la base d'aquests resultats, es mostra que la presència de Labraphac® Lipophile WL 1349 i Transcutol® P confereix tant la capacitat de solubilització com afavoreix la permeació de l'ECN per tal de maximitzar la seva permeació a través de la dermis profunda en comparació amb la formulació comercial.

En cas de fàrmacs altament lipofílics, la seva aparent acumulació en el SCR suggereix que la regió de la pell hidròfila presenta la principal barrera a la permeació (*Baker i cols., 1995*). De fet, quan s'aplica tòpicament una formulació, les concentracions dels fàrmacs imidazòlics en pell existeixen per un període de temps llarg, i fins i tot fins alguns dies després de l'última aplicació (*Veraldi, 2013*). Això és clínicament rellevant per als casos on es requereix una llarga durada de l'efecte terapèutic més enllà del temps d'aplicació; per exemple, per prevenir la re-infecció (*Lademann i cols., 2012*). Tot i que, els resultats dels estudis *in vitro* de penetració de les EM siguin clarament superior, s'han trobat resultats similars *in vivo*, amb una taxa de penetració major de fàrmac en pell. La permeació millorada del fàrmac durant 24 h des del SCR fins l'epidermis permet oferir una sola administració per dia en lloc de la posologia actual de cada 12 h. La reducció del nombre d'aplicacions afavoreix un millor compliment terapèutic del pacient. A més, la residència de la formulació sobre la pell o la mucosa es pot millorar mitjançant l'adhesivitat del carbomer i també les característiques reològiques de l'emulsió múltiple, facilitant la seva aplicació en grans àrees del cos, en contrast amb les formulacions clàssiques.

Tenint en compte que les manifestacions per *Candida spp.* van des de manifestacions tòpiques superficials i/o mucoses fins a manifestacions invasives i disseminades en pacients

immunocompromesos (*Quatresooz i cols., 2008*), els valors més alts de flux de permeació cutània en humans observada per les ME suggereix també major nivells de fàrmac en el lloc d'acció a la pell promovent una millorada alliberació d'econazol a la biofase si s'aplica el producte localment.

En resum, el comportament reològic d'aquesta emulsió múltiple permet una alternativa millorada per a l'aplicació sobre la pell o la mucosa per al tractament d'infeccions fúngiques. Una viscositat inferior i una tixotropia acceptable per aquesta emulsió aquosa afavoreixen la seva extensibilitat. A més, la presència de carbomer pot millorar la seva adherència si s'apliquen sobre els teixits de la mucosa. El tractament de la candidiasi amb ECN requereix una penetració profunda per arribar a la biofase local. Els nivells baixos de fàrmac en pell observats estan d'acord amb els resultats d'altres autors, i també amb el rang de les concentracions inhibidores *in vitro* que es requereixen d'aquest fàrmac contra diferents espècies de *Candida*. Aquesta emulsió múltiple W/O/W ofereix una millorada alliberació del nitrat de econazol que podria ser una excel·lent alternativa a algunes cremes comercials per al tractament de diferents patologies fúngiques d'origen dèrmic.

## ARTICLE III<sup>29</sup>

### **“A NOVEL BIFONAZOLE MULTIPLE EMULSION FOR EPIDERMAL DELIVERY: INFLUENCE OF POLYSORBATE 80 UPON SKIN PENETRATION”.**

#### **“Una nova emulsió múltiple de Bifonazol per a l'alliberament epidèrmic: Influència de l'addició de polisorbat 80 sobre la penetració dèrmica”.**

Alguns dels avantatges de les emulsions múltiples  $W_1/O_1/W_2$  són la protecció de substàncies atrapades, la seva capacitat per incorporar diferents agents actius en les diferents fases de l'emulsió i l'alliberació sostinguda dels seus actius (*Silva-Cunha i cols., 1997*). En aquest treball, es pretén estudiar l'efecte de polisorbat 80 sobre les propietats reològiques de la ME i la penetració en pell del Bifonazol resultant, per millorar les propietats biofarmacèutiques de les formulacions en comparació amb una dispersió O/W comercial de BFZ que conté alcohol ceto-estearílic i altres tensioactius no-iònics.

BFZ és pràcticament insoluble en aigua (0,13 g/ml, pH 7,4, 32 °C) i escassament soluble en etanol (*Consell d'Europa, 2012; Elsayed, 2015*). S'ha dissolt completament en la fase intermèdia lipòfila de la ME, això vol dir que suposa el 17,5% del pes total (*Suñer i cols., 2017b*) d'acord amb *Hameyer i cols. (1996)* que proposen un interval de 5 a 28% (p/p) per a la fase oliosa de la ME. Com es coneix per la literatura, la seva composició (per exemple, l'índex de polaritat) influeix en la mida i morfologia de les gotetes aquoses internes i les gotes múltiples (*Omotoshō, 1986*). A més, ja que aquesta fase oliosa limita la interacció entre les fases aquoses interna i externa, això pot influir en el patró d'alliberament del fàrmac en funció de la fase de distribució del fàrmac. El component majoritari, LP, és un triacilglicerol de cadena mitjana sintètic (C8-10) desproveït d'àcids grassos lliures i mono-diglicèrids, que aconsegueix millors propietats interfacials que els olis clàssics, assegurant una estabilització acceptable (*Suñer i cols., 2017a*). És un bon dissolvent per als ingredients farmacèutics actius lipòfils i s'associa amb una penetració millorada del fàrmac. Com s'ha descrit en diversos treballs (*Devani i cols., 2004; Yang i cols., 2002*), LP genera emulsions múltiples, ja sigui sol o en presència de polisorbat 80. Aquestes mesclades permeten una major solubilització de models de fàrmacs hidròfobs. En el present treball, s'ha observat que la presència de Tween<sup>®</sup> 80 no afecta de manera significativa a la mida de gota de la ME, com es pot veure a la Fig. 2 i Taula 2 de la publicació.

En experiments anteriors s'ha dilucidat la influència del polisorbat 80, com a co-emulsionant de la fase aquosa externa. Els tensioactius polimèrics en combinació amb els emulsionants de baix pes molecular convencionals, es consideren com emulsionants prometedors per

---

<sup>29</sup> Les Taules i Figures descrites en aquest apartat fan referència a elements que estan en la publicació detallada en el apartat de resultats..

emulsions múltiples (Garti, 1997). En el nostre cas, CDC és un emulsionant polimèric de HLB baix ideal per produir l'emulsió inicial  $W_1/O_1$  que després pot ser emulsionada amb una fase aquosa externa gelificada mitjançant una altra combinació de tensioactius que contenen el emulsionant hidròfil (CMB) i polisorbitat 80. A més, certs tensioactius polimèrics poden creuar les membranes de lípids per difusió passiva i interactuar amb bicapes lipídiques (Mathot i cols., 2007) que és útil per millorar la penetració del fàrmac en l'estrat corni epidèrmic.

Pel que fa a l'estabilitat a llarg termini, l'anàlisi conductimètrica detecta possibles fuites d'electròlits de la fase aquosa interna a la fase aquosa externa. Un augment en la conductivitat suggereix una migració d'electròlits com un resultat de la difusió o el trencament de les gotetes (Tedajo i cols., 2001). A més, el fort impacte osmòtic de NaCl pot causar la destrucció de la pel·lícula oliosa i per tant una inversió de fase (Tang i cols., 2012). A partir dels nostres resultats, es pot considerar que la fracció de NaCl alliberat de la fase interna no és rellevant a causa dels valors de conductivitat baixos observats, preservant així intacte la fase aquosa externa ( $W_2$ ) durant l'envelliment del sistema (Muguet i cols., 2001)

Les característiques organolèptiques i valors de pH s'han mantingut gairebé constant. Es coneix que els valors de pH de les dues fases aquoses poden influir en el perfil d'alliberament de fàrmacs ionitzables (Raab i cols., 1980; Nakhare i cols., 1995). Es sap també que l'addició de Tween® 80 augmenta lleugerament el pH de la ME (El-Hadidy i cols., 2012). Tenint en compte el pKa de bifonazol (pKa= 6,29) (Shalaeva i cols., 2008) i el pH de Tween® 80 en solució aquosa (pH = 7) (El-Hadidy i cols., 2012), una especificació de pH neutre per les fases aquoses implica la presència al voltant d'un 50% de fàrmac en forma ionitzada, que facilita tant la solubilització i l'alliberament a la fase externa.

Les observacions per microscòpia òptica tenen la finalitat de buscar informació sobre l'estructura i l'estabilitat de la ME i confirmar l'estructura múltiple com es mostra a la Fig. 1. Canvis en la distribució de la mida total i diàmetre mitjà en volum durant l'estabilitat també s'han investigat amb l'anàlisi de mida de partícula per difractometria làser per detectar l'eventual evolució de les dimensions de les partícules (Ursica i cols., 2005). No es detecten variacions significatives ( $\alpha= 0,05$ ) de mida de les gotetes al llarg de l'estudi d'estabilitat. Considerant D [v,0,9], el 90% de la W/O gotetes cauen per sota de  $172,9 \pm 6,3 \mu\text{m}$  per JMLP01B0, i  $168,1 \pm 3,4 \mu\text{m}$  per JMLP01BT. No es detecta cap efecte del Tween® 80. La difractometria làser mesura únicament la distribució de les grandàries dels glòbuls externs. En conseqüència, la fracció de volum dispers s'estima com si el ME sigui una emulsió O/W (Dickinson, 1991). La distribució de la mida de partícula de la formulació comercial (Fig. 2) és clarament bimodal: pic major es considera com la mida de les gotetes d'emulsió, (valor mitjà  $59,0 \pm 13,9 \mu\text{m}$ ), mentre que el pic més petit pot ser atribuït a cristalls de fàrmac en suspensió, també observats per microscòpia òptica amb llum polaritzada.



El principal avantatge de l'anàlisi Òptica per la tècnica de dispersió múltiple de llum (Turbiscan Lab® Expert) és la detecció prematura dels fenòmens de desestabilització. En el nostre cas, es va mesurar la llum només retrodispersada a causa de l'opacitat de les formulacions (Lemarchand i cols., 2003). Aquesta tècnica proporciona informació cinètica en el procés que condueix a la separació de fases, l'etapa final del trencament, ja que permet la discriminació entre dues classes de desestabilització amb diferents efectes: la migració de partícules (cremat, sedimentació) que és reversible per agitació mecànica i la variació de mida de partícula (coalescència, floculació), que és sovint irreversible (Mengual i cols., 1999). A la Fig. 6 es mostra un exemple, on les desviacions resultants van ser menors del 10% en tota l'alçada de les mesures i prop dels valors de referència durant l'estudi a 24 h.

Les característiques reològiques s'investiguen per avaluar el seu efecte sobre les propietats d'aplicació resultant sobre la pell i com un indicador de l'estabilitat (Grossiord i cols., 1998; Vasiljevic i cols., 2005 ; Krishnaiah i cols., 2014). Com es mostra a la Fig. 3, es constata que els valors de viscositat disminueixen fortament quan es sotmet la mostra a un augment de la velocitat de cisalla de 0 a 100 s<sup>-1</sup>. Les corbes de flux mostren un marcat comportament de flux no-newtonià i pseudoplàstic. D'altra banda, les corbes de flux (Fig. 3) indiquen cert comportament tixotròpic tal com s'aprecia en els reogrames on es mostra un bucle d'histeresi entre el tram ascendent i a sobre el descendent. Es demostra una alteració de la microestructura de les emulsions múltiples sota l'efecte de la velocitat de cisalla. En aquest cas, la cisalla indueix canvis estructurals irreversibles, que podrien interpretar com un trencament de gotes múltiples sense inversió produint una disminució de la fracció de volum i en conseqüència una disminució de la viscositat (Kawashima i cols., 1991).

L'equació matemàtica *Cross* ha resultat ser el millor descriptor per a ambdues emulsions múltiples (JMLP01B i JMLP01BT), el que suggereix flux pseudoplàstic similars sota cisallament i una bona extensibilitat i capacitat d'extensió en la superfície de la pell. L'equació de *Cross* ofereix un model general per als materials pseudoplàstics. L'addició de Tween® 80 ha incrementat significativament la viscositat i també la tixotropia que és una propietat desitjada, ja que contribueix a augmentar la retenció de la formulació en el lloc d'aplicació (Silva-Cunha i cols., 2012). Aquest fet, en línia amb l'efecte del carbomer, afavoreix l'ajust de la consistència requerida de formulacions tixotròpiques per a una aplicació òptima en grans àrees de la pell, com ha estat demostrat per alguns autors (Valenta i cols., 2004). El comportament pseudoplàstic de microemulsions que contenen Tween® 80 encara va ser descrit per El-Hadidy i cols. (2012), i també van esmentar una disminució en la viscositat i tixotropia, el efecte contrari observat amb JMLP01BT. Pel que fa a la formulació comercial, la seva major viscositat disminueix més ràpidament amb la velocitat de cisalla (Fig. 4), mostrant un major efecte tixotròpic.

Alguns autors han descrit que la disminució de la viscositat durant l'envelliment pot ser degut a i) la difusió de molècules d'aigua des de la fase aquosa interna fins a la fase aquosa externa, ii) la disminució de volum de glòbuls en les emulsions  $W_1/O_1/W_2$  o iii) trencament de les gotes múltiples a causa de la pressió osmòtica (*Tirnaksiz i cols ., 2005*).

Els estudis reològics oscil·latoris d'escombrat d'esforç de cisalla i escombrat de freqüència s'utilitzen per trobar la regió viscoelàstica lineal (LVR), la viscositat complexa ( $\eta^*$ ), el mòdul d'emmagatzematge ( $G'$ ) que mesura la capacitat del sistema per emmagatzemar energia elàstica recuperable, i el mòdul de pèrdua ( $G''$ ) que indica la viscositat dinàmica associada amb la pèrdua de viscositat irrecuperable. Com es mostra a la Fig. 4-5 i a la Taula 4 de la publicació, totes les formulacions van mostrar una prevalença del comportament elàstic sobre el comportament viscos ( $G' > G''$ ). *Jiao i cols. (2002)* van descriure les mateixes propietats en les seves formulacions que contenen Tween<sup>®</sup> 80, remarcant la fluïdesa de la formulació, tant per JMLP01B0 com per JMLP01BT. Es presumeix que aquesta estructura elàstica afavoreix l'estabilitat estructural i la resistència a forces externes durant períodes més llargs de temps (*Korhonen i cols., 2000*).

Els estudis experimentals d'alliberació i permeació les quantificacions espectrofotomètriques i cromatogràfiques de BFZ s'han validat prèviament amb acceptable linealitat, precisió, exactitud i recuperació. Les condicions "SINK" han estat garantides durant tots els experiments. La mida de la malla de les membranes de nylon són clarament inferior a les mides de les gotes, de manera que es pot assegurar que els perfils observats són només a causa de les quantitats alliberades de fàrmac. La determinació del TEWL és un procediment estàndard per avaluar la integritat de la pell abans dels experiments. Els valors més alts de TEWL en comparació amb els valors estàndard establerts suggereix defectes de barrera (*Klang i cols., 2013*).

L'alliberació tòpica de BFZ s'ha optimitzat, s'ha cercat un nivell de permeació de la pell similar i una retenció de la pell més gran que una formulació comercial. El Bifonazol sembla ser comparable o superior a altres derivats azòlics antimicòtics en el tractament de la *Tinea versicolor* i les infeccions per dermatòfits però no contra la candidiasi cutània (*Fromtling, 1985*). Atès que, aquests fongs generalment afecten les capes queratinitzades de la pell i la dermis (*Quatresooz i cols., 2008*), la retenció intradèrmica de bifonazol ve a ser com un indicador d'un lliurament eficient.

Els perfils d'alliberament del BFZ de la ME s'han descrit amb la funció de *Higuchi* (arrel quadrada), el que suggereix un procés limitat per la concentració del fàrmac a saturació i assolint valors asimptòtics després de 5 h. Es pot dir que la fase intermèdia oliosa actua com un reservori mantenint la saturació de fàrmac en la fase aquosa externa, per aconseguir una millor saturació de fàrmac en pell. Pel que fa a l'eficiència dels perfils d'alliberament, mesurat amb la Eq. 7 tal com suggereix *Khan (1975)*, la velocitat d'alliberament va ser per JMLP01BT,

la més eficient mentre que la formulació comercial va ser la més lenta que és directament proporcional a l'acumulació de nivells de fàrmac en pell.

Cal notar que la permeació cutània ha estat aproximadament  $10^{-3}$  vegades més baixa que els nivells d'alliberament corresponents. Aquesta diferència s'explica en termes de la lipofília elevada dels fàrmacs imidazòlics i la seva conseqüent baixa permeabilitat. Els valors resultants de flux de permeació BFZ són lleugerament inferiors als obtinguts per *Hashiguchi i cols.* (1998) amb una suspensió lipòfila BFZ a través de pell de ratolí ( $0,3386 \text{ g/cm}^2/\text{h}$ ). En aquest sentit *Hoppel i cols.* (2014) van trobar una major permeació en pell i la penetració de 5-fluorouracil a partir d'emulsions múltiples en comparació amb una macroemulsió O/W.

La formulació de fàrmacs amb una limitada permeabilitat i solubilitat (classe IV) planteja una oportunitat per a una administració tòpica gràcies a la seva baixa absorció sistèmica. Per als fàrmacs antifúngics imidazòlics, la funció de barrera de la pell té un paper decisiu en la penetració del fàrmac. De fet, els estudis farmacocinètics en animals i humans han confirmat que l'administració tòpica de BFZ ha estat ben tolerada (*Fromtling, 1988*) degut a que l'absorció sistèmica després de l'aplicació tòpica és mínima (*Vasiljevic i cols., 2005; Krishnaiah i cols., 2014*). En aquest sentit, la durada de l'efecte antimicòtic dependrà de la extensió de la retenció en les capes exteriors de la pell (*Plempel i cols., 1983*). Es coneix que els fàrmacs imidazòlics s'uneixen reversiblement a la queratina en relació directa amb la seva lipofília (*Hashiguchi i cols., 1998*) i la seva eficàcia pot romandre per períodes de temps prolongats. De fet, en base a la seva eficàcia clínica contra dermatòfits, es recomana l'aplicació tòpica de BFZ una vegada cada 24 h durant dues o tres setmanes (*Quatresooz i cols., 2008; Plempel i cols., 1983; Polak, 1984; Ritter i cols., 1987; Smpc Canesmycospor, 2015*). Sembla clar que hi ha un component addicional fisicoquímic que requereix altes concentracions de fàrmac per aconseguir un efecte fungicida (*Beggs i cols., 1987*).

Hi ha una evidència experimental que el bifonazol penetra a la pell en un grau considerable, mentre que només un percentatge molt baix permea a través de la pell. Els estudis de la penetració del fàrmac mostren que, fins i tot en les capes inferiors de l'epidermis, el BFZ està present en quantitats varies vegades més grans que les concentracions mínimes inhibidores *in vitro* per a dermatòfits, fins i tot al llarg dels fol·licles pilosos que és la via de penetració preferida (*Patzschke i cols., 1983*). Aquesta distribució intracutània heterogènia del fàrmac observada, també, s'ha vist en pell de cobai, detectant a les 2 h al voltant de  $300 \mu\text{g/g}$  en estrat corni però només  $25 \mu\text{g/g}$  en epidermis (*Sobue i cols., 2004*). En el nostre cas, l'acumulació del fàrmac aconseguit amb les dues emulsions múltiples és més gran que els nivells obtinguts amb la crema comercial ( $0,4 \mu\text{g/cm}^2$ ). Aquests resultats suggereixen que el fàrmac queda restringit a les regions lipòfiles de la pell reduint dràsticament la seva permeació a través de la dermis (*Klang i cols., 2012 ; Baker i cols., 1995*) el que afavoreix la seva activitat antifúngica en el teixit epidèrmic.

És generalment acceptat que la penetració de fàrmacs aplicats per via tòpica està clarament relacionada amb el tipus de vehicle (*Daniels i cols., 2007*). Els nivells de retenció obtinguts de Bifonazol, expressats de diferents maneres (*Vázquez i cols., 2014*) es resumeixen a la Taula 6 (publicació). Els nivells de penetració de fàrmac a partir de la formulació que no conté Tween® (2,9 µg/cm<sup>2</sup>) (JMLP01B) són similars als que van obtenir *Hashiguchi i cols.* (1998) amb suspensions de BFZ en miristat d'isopropil (2,4 µg/cm<sup>2</sup>) en pell de ratolí, però és més eficient pel fet que el flux percutani i l'absorció sistèmica en els éssers humans són intrínsecament més baixos que en els rosegadors.

Pel que fa a la formulació que conté polisorbat (JMLP01BT), els nivells d'acumulació en pell són estadísticament més alts (16,6 µg/cm<sup>2</sup>) que els altres (Taula 6 publicació). La formulació amb polisorbat 80 ha incrementat dràsticament aquesta acumulació dins de la pell. Un efecte similar ha estat descrit per *Mohammed i cols.* (2014), que relaciona directament les quantitats de fàrmac en l'estrat corni amb l'absorció corresponent dels excipients en aquest estrat. De manera similar als resultats obtinguts per *Bachhav i cols.* (2011) amb micelles d'econazol, aquest augment significatiu en la deposició en la pell aconseguida amb les emulsions múltiples demostra la seva capacitat per millorar la biodisponibilitat cutània del fàrmac. Això pot traduir-se en una millora de l'eficàcia clínica *in vivo*.

Els polisorbats són un grup d'èsters de sorbità polioxietilenats que s'utilitzen molt com a solubilitzants. Estan disponibles en una ampla gama de productes depenent de la composició d'àcid gras esterificat. Per al nostre propòsit, es prefereix el monooleat de sorbità (grau 80) per aconseguir la millor interacció amb LP en la fase oliosa i, al mateix temps, millorar la penetració en l'estrat corni. L'efecte de Tween® 80 sobre fàrmacs lipòfils (log P per sobre de 4,15) a través de les membranes i mucoses de rata està relacionat amb un augment en el coeficient de difusió que millora el transport de fàrmacs (*Salimi i cols., 2016*).

Pel que fa a la influència de Tween® 80 en la integritat de la pell, es coneix que Tween® 80 és biocompatible amb soques fúngiques (*Garon i cols., 2002*), però pot causar reaccions anafilàctiques (no immunològiques) en individus propensos, tot i que en pacients seleccionats amb dermatitis de contacte la sensibilització és bastant rara (*Tosti i cols., 1990; Coors i cols., 2005*). Els resultats de la hidratació, l'elasticitat i la TEWL amb les ME's suggereixen una integritat acceptable per a la pell que confirma que, en tots els casos, la hidratació de la pell no s'ha vist afectada pels components de la formulació després d'una hora d'aplicació. Aquest impacte ha estat utilitzat per altres autors (*Smits i cols., 2015*) per descriure l'efecte humectant de certs medicaments. Per exemple, la hiperhidrosi és un indicador de la curació de la pell en els tractaments antimicòtics (*Nielsen, 1984*).

Relacionant la innocuïtat de les emulsions múltiples, s'han obtingut diferències significatives ( $P < 0,05$ ) únicament en l'elasticitat ( $t_1 - t_0$ ) entre JMLP01BT i BFZ-CF. Aquestes diferències s'han considerat com no rellevants perquè no va afectar a les variacions de la permeabilitat

d'aigua transepidèrmica, que es descriu com un indicador de la integritat de la pell (Nguyen i cols., 2017). Tots aquests fets suggereixen un efecte no irritant del polisorbat sobre la pell. A més, amb la seva innocuïtat acceptable, el polisorbat 80 és particularment útil per a solubilitzar compostos orgànics hidròfobs i mobilitzar-los a partir de substrats porosos (Cheng i cols., 2017). S'assenyala com un interessant tensioactiu per a una formulació tòpica amb la intenció d'optimitzar l'alliberament de bifonazol a l'estrat corni epidèrmic.

El Bifonazol formulat en emulsions múltiples mostra una permeació a través de la pell clarament inferior i una retenció en la pell més alta en comparació amb una formulació convencional en forma de crema. Aquest èxit es pot atribuir a la naturalesa hidròfila d'aquesta formulació i la presència de tensioactius solubilitzants en la interfase externa que estableixen la fase oliosa i es dissol el fàrmac en una petita quantitat (17%) del pes total de la formulació. Es demostra que la presència de polisorbat 80 (Tween 80®) millora especialment l'acumulació del fàrmac a la pell per tant el tractament de les dermatomicosis és més eficient. Atès que la biofase d'aquest antifúngic contra *Tinea* i Pitiriasi es troba a l'estrat corni epidèrmic, aquest efecte del polisorbat 80 afavoreix la seva presència en els teixits diana infectades per dermatofitosis superficials.

L'addició de polisorbat 80 mostra un augment en el pH, la viscositat i viscoelasticitat, i una disminució de l'extensibilitat. El comportament reològic de la formulació amb polisorbat (JMLP01BT) permet una excel·lent alternativa per a l'aplicació dèrmica en les infeccions fúngiques de la pell. Per tant, l'emulsió múltiple W/O/W amb bifonazol proposada és una opció preferida per l'alliberació del bifonazol i una bona alternativa a les formulacions comercialment disponibles per al tractament de les dermatomicosis.

## CAPITOL V. CONCLUSIONS

---



## 5.1 CONCLUSIONS

- 1- Les emulsions múltiples elaborades amb CLT, ECN i BFZ contenen com excipients: 11% Triglicèrids de cadena mitja (TGC) i 2% estearat de sorbità (Span® 60) com fase oliosa, 1,5% cetil dimeticona copoliol (CDC) com emulgent primari, i 0,7% cocamidopropilbetaina (CMB) com emulgent secundari. En el cas de l'econazol s'ha utilitzat 2% de Transcutol® P enlloc d'estearat de sorbità.
- 2- Totes les formulacions elaborades presenten un aspecte homogeni, un pH eudèrmic i uns valors de conductivitat que estadísticament no presenten diferències significatives al llarg del temps. La caracterització mitjançant microscòpia òptica ha permès observar l'estructura múltiple dels preparats obtinguts, amb mida de gota aproximadament: [CLT]= 10-40 µm, [ECN]= 10-200 µm i [BFZ]= 10-50 µm.
- 3- La preformulació i optimització de les emulsions múltiples W/O/W ha permès obtenir unes formulacions amb un grau alt d'encapsulació de fàrmac:  
[CLT]= 85,6-97,4%      [ECN]= 85,3%      [BFZ]= 90,6-95,8%
- 4- Els estudis reològics a 25 °C, de les formulacions seleccionades presenten un flux no-newtonià de tipus pseudoplàstic. Totes les formulacions presenten una disminució en els valors de viscositat quan es sotmet la mostra a velocitat de cisalla de 0 a 100 s<sup>-1</sup>. En tots els casos l'emulsió múltiple resulta ser més fluida respecte a les referències comercials, fet que millora la seva aplicabilitat. En els estudis reològics oscil·latoris les formulacions han revelat una prevalença del comportament elàstic sobre el comportament viscos (G' > G'') conegut com efecte "elastic plateau".
- 5- L'estabilitat macroscòpica de les formulacions elaborades s'ha demostrat adequada durant 6 mesos a 30 °C. A 40 °C les estabilitats han estat: [CLT]≥ 36 setmanes, [ECN]= 2 setmanes i [BFZ]= 10 setmanes.
- 6- Les validacions de les metodiques analítiques dels fàrmacs CLT, ECN i BFZ per HPLC i per Espectrofotometria UV-Vis demostren que es disposa d'una adequada linealitat, exactitud i precisió en els àmbits de concentracions que requereixen els estudis realitzats:  
UV-Vis: [CLT]= 1,25-20,00 µg/ml      [ECN]= 2,61-10,00 µg/ml  
          [BFZ]= 2,61-10,00 µg/ml  
HPLC: [CLT]= 0,625-20,00 µg/ml      [ECN]= 3,125-100,00 µg/ml  
          [BFZ]=1,56-100,00 µg/ml



- 7- Els perfils d'alliberació de les W/O/W segueixen una cinètica en el cas del CLT de tipus *Michaelis-Menten*; en el cas del ECN cinètica d'ordre u, i en el cas del BFZ cinètica d'arrel quadrada o *Higuchi*. Els valors asimptòtics de l'alliberació s'assoleixen al cap de 4 h per ECN i 3 h per BFZ (JMLP01BT) respectivament.
- 8- Retenció de Fàrmac en pell (quantitat retinguda en pell):
- En el cas de W/O/W-ECN els valors són estadísticament iguals als obtinguts amb ECN-CF ( $15,89 \mu\text{g}/\text{cm}^2 \pm 15,91 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ , respectivament).
  - En el cas del BFZ, els resultats amb JMLP01BT (amb polisorbat) són estadísticament superiors a JMLP01B (sense polisorbat) i BFZ-CF ( $16.60 \pm 7.09 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ;  $2.87 \pm 0.36 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  i  $0.38 \pm 0.07 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ , respectivament).
- 9- En els estudis de permeació *ex-vivo* en pell humana s'observen nivells de permeació molt baixos, preservant, per tant, l'aparició d'efectes sistèmics:
- En el cas del ECN el flux transdèrmic obtingut resulta ser 3 vegades superior als obtinguts amb la ECN-CF. Això permet perllongar la seva duració d'acció fins a una aplicació cada 24 h a les zones subepidèrmiques que és on s'acumula *Candida* sp.
  - En el cas del BFZ, la inclusió de polisorbat 80 (JMLP01BT) ha permès reduir el flux transdèrmic i alhora incrementar significativament l'acumulació de fàrmac en pell, millorant així l'alliberació del fàrmac a les estructures epidèrmiques on s'hi troben els dermatòfits.
- 10- Dels estudis d'eficàcia antimicrobiana *in vitro* es pot afirmar que la incorporació del fàrmac Clotrimazol en les emulsions múltiples proporciona una major eficàcia en comparació amb el fàrmac lliure. En el cas de l'Econazol la EM aconsegueix la mateixa eficàcia que la ECN-CF garantint nivells de fàrmac iguals o superiors a les MIC a 24 h. En el cas del Bifonazol els resultats no han estat reproduïbles per raons d'incompatibilitat amb els excipients.

## 5.1 CONCLUSIONS:

- 1- Multiple emulsions were prepared containing as excipients: 11% medium chain triglycerides (TGC) and 2% sorbitan stearate (Span® 60) as oily phase, 1,5% cetyl dimethicone copolyol (CDC) as primary emulsifier and 0,7% cocamidopropyl betaine (CMB) as secondary emulsifier. In the case of econazole 2% Transcutol® P instead of sorbitan stearate (Span® 60) was used.
- 2- All formulations prepared have a homogeneous aspect, eudermic pH and conductivity values no statistically significant differences over time. The characterization by optical microscopy allowed to observe the multiple structure of the preparations obtained, with droplet size approximately [CLT] = 10-40 µm [ECN] = 10-200 µm and [BFZ] = 10-50 µm.
- 3- Preformulation and optimization of multiple emulsion W/O/W formulations with a high levels of drug encapsulation have been obtained:  
[CLT]= 85,6-97,4%      [ECN]= 85,3%      [BFZ]= 90,6-95,8%
- 4- The rheological studies at 25 °C demonstrate that the flow curves have marked non-Newtonian pseudoplastic shear-thinning flow behaviour. All formulations showed a decrease in viscosity with increasing shear rate from 0 to 100 s<sup>-1</sup>. In all cases, the multiple emulsion proves to be more fluid with respect to the commercial references, which improves its applicability. In rheological oscillatory studies, formulations have revealed a prevalence of elastic behaviour versus viscous behavior (G' > G'') effect known as "elastic plateau."
- 5- The macroscopic stability of formulations developed has proved suitable for 6 months at 30 °C. At 40 °C the stabilities were:  
[CLT] ≥ 36 weeks [ECN] = 2 weeks [BFZ] = 10 weeks.
- 6- The methodical analytical validation of drug CLT, ECN and BFZ by HPLC and UV-Vis spectrophotometry show that there is an adequate linearity, accuracy and precision in the ranges of concentrations that the studies require:  
UV-Vis: [CLT] = 1.25 to 20.00 µg/ml      [ECN] = 2.61 to 10.00 µg/ml  
          [BFZ] = 2.61 to 10.00 µg/ml  
HPLC: [CLT] = 0.625 to 20.00 µg/ml      [ECN] = 3.125 to 100.00 µg/ml  
          [BFZ] = 1.56 to 100.00 µg/ml

- 7- The profiles follow a release kinetics of *Michaelis-Menten*-type in the case of CLT; in the case of ECN first order kinetics, and in the case of BFZ, square root kinetics or *Higuchi*. The asymptotic values of the release are achieved after 4 h for ECN and 3 h for BFZ respectively.
- 8- Skin penetration Drug (amount retained in skin):
- In the case of the formulation with ECN values are statistically equal to those obtained with ECN-CF and in the range of 15,89  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  and 15,91  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ , respectively.
  - In the case of BFZ, the results for JMLP01BT are statistically higher than those for JMLP01B and BFZ-CF (16.60  $\pm$  7.09  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ; 2.87  $\pm$  0.36  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  i 0.38  $\pm$  0.07  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  respectively).
- 9- The ex-vivo permeation studies on human skin showed very low levels of permeation, preserving thus the appearance of systemic effects.
- In the case of ECN, the transdermal flow obtained turns out to be three times higher than that obtained with the ECN-CF. This allows to prolong its duration of action up to 24 hours for each application in subepidermis areas where *Candida sp* accumulates.
  - In the case of BFZ, the incorporation of polysorbate 80 (JMLP01BT) allowed to significantly increase the accumulation of drug in skin (10 times more than BFZ-CR) and simultaneously reduce the transdermal flux, thus improving the release of the drug to the epidermal structures where there are the dermatophytes.
- 10- From the antimicrobial efficacy studies in vitro can conclude that the incorporation of CLT in the multiple emulsion provides greater efficacy compared to the free drug. In the case of ECN reaches the same efficacy than the ECN-CF effectively guaranteeing drug levels greater than or equal to the MIC in 24 hours. In the case of BFN the results were not reproducible on grounds of incompatibility with the excipients.

## CAPITOL VI. BIBLIOGRAFIA ADDICIONAL

---



## 6.1 BIBLIOGRAFIA ADDICIONAL

### A

Albery WJ., Hadgraft J. Percutaneous absorption: in vivo experiments. *J. Pharm. Pharmacol.* 1979;31:140-147.

Attia MA., Habib FS. Pilocarpine delivery from multiple emulsions. *STP Pharma Prac.* 1986;2(18):636-640.

Avdeef A., Bendels S., Tsinman O., Tsinman K., Manfred K. Solubility-Excipient Classification Gradient Maps. *Pharmaceutical Research.* 2007;24(3):530-545.

### B

Bachhav YG., Mondon K., Kalia YN., Gurny R., Möller M. Novel micelle formulations to increase cutaneous bioavailability of azole antifungals. *J. Control. Rel.* 2011;153:126-132.

Baker EJ., Hadgraft J. *In vitro* percutaneous absorption of arildone, a highly lipophilic drug, and the apparent no-effect of the penetration enhancer Azone in excised human skin. *Pharm. Res.* 1995;12:993-997.

Barakat HS., Darwish IA., El-Khordagui LK., Khalafallah NM. Development of Naftifine Hydrochloride Alcohol-Free Niosome Gel. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 2009;35(5):631-637.

Baron JM., Merk HF. Drug metabolism in the skin. *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology.* 2001; 1(4):287-291.

Barry BW. Methods for studying percutaneous absorption. A: Barry BW. Editor, *Dermatological formulation.* New York: Marcel Dekker. 1983. p. 234-294.

Becher P. *Emulsiones: Teoría y Práctica.* 1ª edición española de la 2ª americana. Madrid: Ed. Blume. 1972.

Becher P. *Encyclopedia of emulsion Technology.* Volume 1 Basic Theory. New York: Marcel Dekker. 1983.

Beggs WH., Hughes CE. Exploitation of the direct cell damaging action of antifungal azoles. *Diagn. Microb. Infect. Dis.* 1987;6:1-3.

Bennet JE. Chapter 57: Antifungal agents. A Brunton L., Chabner B.A., Knollmann B.C. Goodman & Gilman's. *The Pharmacological Basis of Therapeutics.* 12th ed. Goodman & Gilman. Mc Graw Hill; 2011.

Berbee M., Taylor JW. Detecting morphological convergence in true fungi, using 18S rRNA gene sequence data. *Biosystems.* 1992;28:117-125.

Berg D., Bfichel KH., Plempel M., Regel E. Biochemical characteristics of bifonazole. In R. A. Fromtling (ed.), *Recent trends in the discovery, development and evaluation of antifungal agents.* J. R. Prous Publishers, Barcelona: 1987. p. 313-334.

Betanzos S., Chmel NP., Zimmerman MT., Barrón LR., Garino C., Salassa L., et al. Redox-active and DNA-binding coordination complexes of clotrimazole. *Dalton Trans.* 2015;44:3673-3685.

Bhalaria MK., Naik S., Misra AN. Ethosomes: A Novel Delivery System for Antifungal Drugs in the Treatment of Topical Fungal Diseases. *Ind. J. Exp. Biol.* 2009;47(5):368-375.

Bhalekar MR., Pokharkar V., Madgulkar A., Patil N., Patil N. Preparation and evaluation of miconazole nitrate loaded solid lipid nanoparticles for topical delivery. *AAPS PharmSciTech.* 2009;10(1):289-296.

Blanco-Prieto MJ., Delie F., Fattal E., Tartar A., Puisieux F., Gulik A., et al. Characterization of V3 BRU peptide-loaded small PLGA microspheres prepared by (W/O/W) emulsion solvent evaporation method. *Int. J. Pharm.* 1994;111:137-145.

Blanco-Prieto MJ., Fattal E., Puisieux F., Couvreur P. Chapter 15. The multiple emulsion as a common step for the design of polymeric microparticles. A Grossiord JL., Seiller M., eds. *Multiple Emulsion: Structure, Properties and Applications*. Paris: Editions de Santé; 1998. p. 397-436.

Boddé HE., Kruithof MA., Brussee J., Koerten HK. Visualisation of normal and enhanced HgCl<sub>2</sub> transport through human skin in vitro. *Int. J. Pharm.* 1989;53:3-24.

Boix A., Calpena AC., Doménech J. Absorción percutánea. Procesos y dispositivos. A Doménech J., Martínez J., Peraire C. (Eds.). *Tratado general de Biofarmacia y Farmacocinética. Volum II*. Editorial Síntesis: Madrid; 2013. p. 93-124.

Boix Montañés A. Tesis Doctoral: Estudios de la Permeación Transdérmica de Alprazolam. Universitat de Barcelona. 1997.

Bonifaz A. *Micología Médica Básica*. 4ª edición. McGraw-Hill Interamericana Editores. México. 2012.

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. *Int. J. Pharm.* 1993;98(1-3):93-99.

Borhade V., Pathak S., Sharma S., Patravale V. Clotrimazole nanoemulsion for malaria chemotherapy. Part II: Stability assessment, *in vivo* pharmacodynamics evaluations and toxicological studies. *Int. J. Pharm.* 2012;431:149-160.

Brisson P. Percutaneous absorption. *Canad. Med. Ass. J.* 1974;110:1182-1185.

Bronaugh RL, Maibach HI. *Percutaneous Absorption: Drugs-Cosmetics-Mechanisms-Methodology*. Third Edition. CRC Press. New York: Marcel Dekker; 1999.

Brugmans JP., Thienpont DC., Van Wongaarden I., VanparUs OF., Schulmans VL., Lauwers HL. Mebendazole in enterobiasis. *J. Am. Med. Assoc.* 1971;217:313-316.

Bseiso EA., Nasr M., Sammour O. Recent advances in topical formulation carriers of antifungal agents. *Indian J. Dermatol. Venereol. Leprol.* 2015;81(5):457-463.

Buchel KH., Draber W., Regel E., Plempel M. Synthesis and properties of clotrimazole and other antimycotic 1-triphenyl-methyl imidazoles. *Drugs Germ.* 1972;15:79-94.

Burns T., Breathnach S., Cox N., Griffiths C. *Rook's Textbook of dermatology*. Eighth Edition. United Kingdom: Wiley-Blackwell; 2010.

Butani D., Yewale C., Misra A. Amphotericin B topical microemulsion: Formulation, characterization and evaluation. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2014;116:351-358.

## C

Caballero F., Jurado J., López A. *Guía de Buena Práctica Clínica en Infecciones fúngicas. Atención Primaria de Calidad*. Organizacióm Médica Colegial y Ministerio de Sanidad y Consumo. España. 2005.

Cahn RP., Ho WS., Li NN. Chapter 14. Liquid Membrane processing: Concept, design, applications and future. A Grossiord JL., Seiller M., eds. Multiple Emulsion: Structure, Properties and Applications. Paris: Editions de Santé; 1998. p. 373-396.

Calvo Manso E. Tesis Doctoral: Evaluación de la Patogenia Experimental y Sensibilidad a los Antifúngicos de Hongos Filamentosos. Universitat Rovira I Virgili. Espanya. 2012.

Cao XF., Chu WJ., Cao YB., Yang YS. Design and synthesis of novel antifungal triazole derivatives with good activity and water solubility. Chinese Chemical Letters. 2013;24:303-306.

Carlile MJ., Watkinson SC., Gooday GW. The fungi as a major group of organisms. A: The fungi. 2nd ed. Academic Press: London; 2001. p. 1-9.

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 and Surfaces B: Biointerfaces. 2009;72:155-160.

Cervera LA., Maestre JR., Moreno R. y grupo para el estudio del consumo de antimicrobianos en España. Consumo de antifúngicos de uso tópico en España. Rev. Esp. Quimioterap. 2001;14:340-344.

Chakrabarti AK., Chowdhury SB., Chakrabarty S., Chakrabarty T., Mukherjee DC. Liquid membrane multiple emulsion process of chromium (VI) separation from waste waters. Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects. 1995;103:59-71.

Chakrabarti AK., Chowdhury SB., Mukherjee DC. Liquid membrane multiple emulsion process of separation of copper (II) from waste waters. Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects. 2000;166:7-25.

Chen YC., Liu DZ., Liu JJ., Chang TW., Ho HO., Sheu MT. Development of terbinafine solid lipid nanoparticles as a topical delivery system. Int. J. Nanomedicine. 2012;7:4409-4418.

Cheng M., Zeng G., Huang D., Yang C., Lai C., Zhang C., et al. Advantages and challenges of Tween 80 surfactant-enhanced technologies for the remediation of soils contaminated with hydrophobic organic compounds. Chem. Engin. J. 2017;314:98-113.

Chien YW. Novel drug delivery systems. Fundamentals, Developmental Concepts, and Biomedical Application. Marcel Dekker, NY. 1982.

Chien YW. Novel drug delivery systems. Transdermal Drug Delivery and Delivery Systems. New York: Marcel Dekker; 1994. p. 301-315.

Chudasama A., Patel V., Nivsarkar M., Vasu K., Shishoo C. Investigation of Microemulsion System for Trans- dermal Delivery of Itraconazole. J. Adv. Pharm. Tech. Res. 2011;2(1):30-38.

Coors EA., Seybold H., Merk HF., Mahler V. Polysorbate 80 in medical products and nonimmunologic anaphylactoid reactions. Ann. Allergy Asthma Immunol. 2005;95:593-599.

Council of Europe. European Pharmacopoeia (Ph. Eur.) 8.8 edition. Strasbourg. 2016.

Council of Europe. The European Pharmacopoeia Commission. Econazole monograph 8. 04/2012: p. 1395. Strasbourg Cedex. France. 2012

Couvreur P., Puisieux F. Nano and microparticles for the delivery of polypeptides and proteins. Adv. Drug Del. Rev. 1993;10:141-162.



Crank J. The diffusion equations. A Crank, J. (Ed.). The Mathematics of Diffusion. 2nd ed. Oxford: Clarendon Press; p. 1-10. 1975.

Cross SE., Roberts MS. The effect of occlusion on epidermal penetration of parabens from a commercial allergy test ointment, acetone and ethanol vehicles. *J. Invest. Dermatol.* 2000;115(5): 914-918.

#### D

Daniels R., Knie U. Galenics of dermal products. Vehicles, properties and drug release. *J. Dtsch. Dermatol. Ges.* 2007;5:367-383.

Das S., Ng WK., Tan RB. Are Nanostructured Lipid Carriers (NLCs) Better than Solid Lipid Nanoparticles (SLNs): Development, Characterizations and Comparative Evaluations of Clotrimazole-Loaded SLNs and NLCs. *Eur. J. Pharm. Sci.* 2012;47(1):139-151.

Davis SS. Liquid membranes and multiple emulsions. *Chem. Ind.* 1981;19:683-687.

Davis SS., Walker IM. Multiple emulsions as a targetable delivery systems. *Methods in Enzymology.* 1987;149:51-64.

De Luca M., Grossiord JL., Médard JM., Vaution C., Seiller M. A stable w/o/w multiple emulsions. *Cosm. Toil.* 1990. 105(Nov):65-69.

De Luca M., Vaution C., Rabaron A., Seiller M. Classification et obtention de émulsions multiples. *STP Pharma Sci.* 1988;4(8):679-687.

Dean S.H. Understanding Permeation Enhancement Technologies. Drug permeation Enhancement. New York: Marcel Dekker; 1994.

Del Pozo A., Suñé JM. Los ceratos como excipientes de pomadas-emulsiones: absorción, retención y cesión de la fase acuosa. *Galenica Acta.* 1952;5(2):105-132.

De-Meere ALJ., Tomlinson E. Theoretical and experimental studies on the origin of pH-absorption shifts. *Int. J. Pharm.* 1983;17:331-346.

Devani M., Ashford M., Craig DQM. The emulsification and solubilisation properties of polyglycolysed oils in self-emulsifying formulations. *J. Pharm. Pharmacol.* 2004;56(3):307-16.

Devi M., Kumar SM., Mahadevan N. Amphotericin B loaded vesicular systems for the treatment of topical fungal infection. *Int. J. Recent Adv. Pharm. Res.* 2011;4:37-46.

Dickinson E., Evison J., Gramsshaw JW., Schwope D. Flavour release from a protein-stabilized water-in-oil-in-water emulsion. *Food Hydrocolloids.* 1994;8(1):63-67.

Dickinson E., Evison J., Owusu R.K.. Preparation of fine protein-stabilized water-in-oil-in water emulsions. *Food Hydrocolloids.* 1991;5:481-485.

Dyas AM., Delargy H. Econazole nitrate. A: Brittain HG, ed. Analytical Profiles of Drug Substances and Excipients, Vol. 23. Milford: Elsevier Science; 1994. p.125-154.

#### E

El Laithy HM., El-Shaboury KM. The development of cutina lipogels and gel microemulsion for topical administration of fluconazole. *AAPS PharmSci. Tech.* 2002;3:E35.

El-Badry M., Fetih G., Shakeel F. Comparative topical delivery of antifungal drug croconazole using liposome and micro-emulsion based gel formulations. *Drug Deliv.* 2014;21:34-43.

El-Hadidy GN., Ibrahim HK., Mohamed MI., El-Milligi MF. Microemulsions as vehicles for topical administration of voriconazole: formulation and *in vitro* evaluation. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 2012;38(1):64-72.

Elmoslemany RM., Abdallah OY., El-Khordagui LK., Khalafallah NM. Propylene Glycol Liposomes as a Topical Delivery System for Miconazole Nitrate: Comparison with Conventional Liposomes. *AAPS Pharmaceutical Science Technology.* 2012;13(2):723-731.

Elsayed, MA. Development of topical therapeutics for management of onychomycosis and other nail disorders: A pharmaceutical perspective. *J. Control. Release.* 2015;199:132-144.

Erbagci Z. Deep dermatophytoses in association with atopy and diabetes mellitus: Majocchi's granuloma *trichophyticum* or dermatophytic pseudomycetoma. *Mycopathologia* 2002;154:163-169.

Erdal MS., Güngör S., Özsoy Y. Microemulsions of Naftifine Hydrochloride: Characterization of Impact on Stratum Corneum Permeability with ATR-FTIR Spectroscopy. *Eur. J. Pharm. Sci.* 2011;44:159-160.

## F

Fernández-Campos F., Clarés B., Serrano O., Merino C., Calpena AC. Evaluation of Novel Nystatin Nanoemulsion for Skin Candidosis Infections. *Mycoses.* 2013;56(1):70-81.

Ferrándiz C. Enciclopèdia de Medicina i salut: pell i aparell locomotor. Enciclopèdia Catalana, S.A. Vol. 1. Cap. 1; 1989. p. 15-38.

Fick AE. On liquid diffusion. *The London, Edinburgh and Dublin Philosophical Magazine and Journal of Science* 1855;10(63):30-39.

Florence AT, Whitehill D. The formulation and stability of multiple emulsions. *Int. J. Pharm.* 1982;11(4):277-308.

Florence AT., Whitehill D. Some features of breakdown in water-in-oil-in-water multiple emulsions. *J. Colloid Int.* 1981;79(1):243-256.

Flynn GL., Stewart B. Percutaneous Drug Penetration: Choosing candidates for transdermal development. *Drug Dev. Res.* 1998;13:169-185.

Fore J., A Review of Skin and the Effects of Aging on Skin Structure and Function. *Ostomy Wound Manage.* 2006;52(9):24-35.

Frankenfeld JW., Fuller GC., Rhodes CT. Potential use of liquid membranes for emergency treatment of drug overdose. *Drug Dev. Commun.* 1976;2:405-419.

Franz TJ. Percutaneous absorption. On the relevance of *in vitro* data. *J. Invest. Dermatol.* 1975;64(3):190-195.

Fredro-Kumbaradzi E., Popovska-Pavlovska F., Simov A., Goracinova K. Phase inversion of multiple water/oil/water into water/oil emulsion caused by osmotic pressure gradient. *Acta Pharm.* 1996;46:177-185.

Fromtling, R. A. Bifonazole (MycosporRp) an update. *Drugs Today.* 1985;21:401-404.

## G

Garon D., Krivobok S., Wouessidjewe D., Seigle-Murandi F. Influence of surfactants on solubilization and fungal degradation of fluorene. *Chemosphere*. 2002;47:303-309.

Garti N. Chapter 3: Influence of the formulation on the characteristics and stability of Multiple Emulsions. A Grossiord JL., Seiller M., eds. *Multiple Emulsion: Structure, Properties and Applications*. Paris: Editions de Santé; 1998. p. 81-116.

Garti N. Double emulsions-scope, limitations and new achievements. *Colloids Surf*. 1997;123-124:233-246.

Gattefosse. Technical information. Consulted February 2016.

Ge S., Lin Y., Lu H., Li Q., He J., Chen B., et al. Percutaneous delivery of econazole using microemulsion as vehicle: formulation, evaluation and vesicle-skin interaction. *Int. J. Pharm*. 2014;465:120-131.

Geiger S., Tokgoz S., Fructus A., Jager-Lezer N., Seiller M., Lacombe C., et al. Kinetics of swelling-breakdown of a W/O/W multiple emulsion: possible mechanisms for the lipophilic surfactant effect. *J. Control. Rel*. 1998;52:99-104.

Godefroi EF., Heeres J., Van Cutsem J., Janssen PAJ. The preparation and antimycotic properties of derivatives of 1-phenethylimidazole. *J. Med. Chem*. 1969;12:784-791.

Goldsworthy MC., Gertler SJ. Fungicidal and phytotoxic properties of 506 synthetic organic compounds. *Chem. Abstr*. 1949;43:6351.

Griffin WC. Calculation of HLB values of non-ionic Surfactants. *J. Soc. Cosmetic Chemists*. Vol. 5. p. 249-355. 1954.

Griffin WC. Classification of Surface-active agents by HLB. *Journal of Society of Cosmetic Chemists*. 1949;1:311-326.

Grossiord JL. Chapter 6. Rheology of W/O/W Multiple emulsions: Formulation Characterization and breakup mechanisms. A Grossiord JL., Seiller M., eds. *Multiple Emulsion: Structure, Properties and Applications*. Paris: Editions de Santé; 1998. p.169-192.

Grossiord JL., Quemada D. Des concepts aux outils. Comprendre la Rhéologie. Coussot P i Grossiord J.L. Eds. EDP Sciences; 2002. p. 191-221.

Güngör S., Erdal MS., Buket A. New Formulation Strategies in Topical Antifungal Therapy. *Journal of Cosmetics, Dermatological Sciences and Applications*. 2013;3:56-65.

Gupta M., Goyal AK., Paliwal SR., Paliwal R., Mishra N., Vaidya B., et al. Development and characterization of effective topical liposomal system for localized treatment of cutaneous candidiasis. *J. Liposome Res*. 2010;20:341-350.

Gupta M., Vaidya B., Mishra N., Vyas SP. Effect of Surfactants on the Characteristics of Fluconazole Niosomes for Enhanced Cutaneous Delivery. *Artificial Cells, Blood Substitutes, and Immobilization Biotechnology*. 2011;36(6):376-834.

Gupta M., Vyas S.P. Development, Characterization and *in Vivo* Assessment of Effective Lipidic Nanoparticles for Dermal Delivery of Fluconazole against Cutaneous Candidiasis. *Chemistry Physics of Lipids*. 2012;165(4):454-461.

- Hameyer P., Jenni KR. Emulsifiers for multiple emulsions. *Cosm. Toil.* 1996;111:39-48.
- Hashem FM., Shaker DS., Ghorab MK., Nasr M., Ismail A. Formulation, characterization, and clinical evaluation of microemulsion containing clotrimazole for topical delivery. *AAPS PharmSciTech.* 2011;12:879-886.
- Hashiguchi T., Kodama A., Ryu A., Otagiri M. Retention capacity of topical imidazole antifungal agents in the skin. *Int. J. Pharm.* 1998;161:195-204.
- Havlickova B., Czaika V., Friedrich M. Epidemiological trends in skin mycoses worldwide. *Mycoses.* 2008;51(4):2-15.
- Hawksworth DL. The magnitude of fungal diversity: the 1.5 million species estimate revisited. *Mycol Res.* 2001;105:1422-1432.
- Herbert WJ. Multiple emulsions: a new form of mineral-oil antigen adjuvant. *Lancet* 2. 1965;771-774.
- Herrling S., Sous H., Kruppe W., Osterloh G., Muckter H. Experimentelle Untersuchungen über eine neue gegen Pilze wirksame Verbindung. *Arneim. Forsch.* 1959;9:489-494.
- Heusch R., Reizlein K., Disperse systems and dispersants in Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry (Wiley-VCH Verlag); 2002;A8:577-600.
- Hoppel M., Mahrhauser D., Stallinger C., Wagner F., Wirth M., Valenta, C. Natural polymer-stabilized multiple water-in-oil-in-water emulsions: a novel dermal drug delivery system for 5-fluorouracil. *J. Pharm. Pharmacol.* 2014;66(5):658-667.
- Hutchinson FG., Furr BJA. Biodegradable polymer systems for the sustained release of polypeptides. *J. Control. Rel.* 1990;13: 279-294.
- I
- Ismail S., Mohamed AA., Hassan SA. In vitro and in vivo studies on oftalmic preparations of xilocaine hydrochloride. *Bull. Pharm. Sci. Assiut-Univ.* 1989;12(1):68-69.
- J
- Jadhav KR., Kadam VJ., Pisal SS. Formulation and Evaluation of Lecithin Organogel for Topical Delivery of Fluconazole. *Current Drug Delivery.* 2009;6(2):174-813.
- Jain S., Jain S., Khare P., Gulbake A., Bansal D., Jain SK. Design and development of solid lipid nanoparticles for topical delivery of an antifungal agent. *Drug Deliv* 2010;17:443-451.
- Jerchel D., Fischer H., Fracht M. Zur Darstellung der Benzimidazole. *Liebigs Ann. Chem.* 1952;575:162-173.
- Jiang J., Mei Z., Xu J., Sun D. Effect of inorganic electrolytes on the formation and the stability of water-in-oil (W/O) emulsions. *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects.* 2013;429:82-90.
- Jiao J., Rhodes DG., Burgess DJ. Multiple emulsion stability: Pressure balance and Interfacial Film strength. *J. Coll. Int. Sci.* 2002;250:444-450.
- Johal HS., Garg T., Rath G., Goyal AK. Advanced topical drug delivery system for the management of vaginal candidiasis. *Drug Deliv.* 2016;23:550-563.

K

- Kalia Y.N., Guy R.H. Modeling transdermal drug release. *Adv. Drug Del. Rev.* 2001;48:159-172.
- Kassem MA., Attia M.A., Safwat SM., Mahdy M. Preparation and evaluation of hydrocortisone multiple emulsions in rabbit's eye. *Pharm Ind.* 1994;56(6):584-588.
- Kassem MA., Safwat SM. Attia, El-Mahdy MM. Influence of the phase volume ratio of multiple emulsions on the ocular activity. *STP Pharma Sci.* 1995;5(4):309-315.
- Katz, MD Aaron S. Topical antifungal agents. *Current Problems in Dermatology.* 2000;12(5):226-229.
- Kawashima Y., Hino T., Takeuchi H., Niwa T., Horibe K. Rheological study of w/o/w emulsions by a cone-and-plate viscometer: Negative thixotropy and shear-induced phase inversion. *Int. J. Pharm.* 1991;72(1):65-77.
- Kerridge D., Vanden-Bossche H. Drug discovery: a biochemist approach. A Ryley, J.F. (ed.): *Handbook of experimental pharmacology. Chemotherapy of fungal diseases.* Springer Verlag, Berlin-Heildeberg. 1990. p. 31-76.
- Keshri L., Pathak K. Development of thermodynamically stable nanostructured lipid carrier system using central composite design for zero order permeation of Econazole nitrate through epidermis. *Pharm. Dev. Technol.* 2012;18:634-644.
- Khan KA. The concept of dissolution efficiency. *J. Pharm. Pharmacol.* 1975;27:48-49.
- Klang V., Schwarz JC., Haberfeld S., Xiao P., Wirth M., Valenta C. Skin integrity testing and monitoring of *in vitro* tape stripping by capacitance-based sensor imaging. *Skin Res. Technology.* 2013;19:e259-e272.
- Klang, V., Haberfeld, S., Hartl, A., Valenta, C. Effect of  $\gamma$ -cyclodextrin on the *in vitro* skin permeation of a steroidal drug from nanoemulsions: Impact of experimental setup. *Int. J. Pharm.* 2012;423:535-542.
- Korhonen M., Lehtonen J., Hellen L., Hirvonene J., Yliruusi J. Rheological properties of three component creams containing sorbitan monoesters as surfactants. *International Journal of Pharmaceutics.* 2002;247(1-2):103-114.
- Korhonen M., Niskanen H., Kiesvaara J., Yliruusi J. Determination of optimal combination of surfactants in creams using rheology measurements. *Int. J. Pharm.* 2000;197:143-151.
- Krishnaiah YS., Xu X., Rahman Z., Yang Y., Katragadda U., Lionberger R., et al. Development of performance matrix for generic product equivalence of acyclovir topical creams. *Int. J. Pharm.* 2014;475(1-2):110-22.
- Kumari B., Karthikeyan K. Effect of chitosan coating on microemulsion for effective dermal clotrimazole delivery. *Pharmaceutical Development and Technology.* 2017;22(4): 617-626.

L

- Lademann J., Patzelt A., Schanzer S., Richter H., Thiede G., Havlickova B., et al. Non-invasive analysis of penetration and storage of isoconazole nitrate in the stratum corneum and the hair follicles. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2012;80:615-620.

Lademann J., Richter H., Schanzer S., Knorr F., Meinke M., Sterry W., et al. Penetration and storage of particles in human skin: perspectives and safety aspects. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2011;77: 465-468.

Lane ME. Skin penetration enhancers. *Int. J. Pharm.* 2013;447:12-21.

Laugel C., Baillet A., Youenang M.P., Marty J.P., Ferrier D. Oil-water-oil multiple emulsions for prolonged delivery of hydrocortisone after topical application: comparison with simple emulsions. *Int. J. Pharm.* 1998;160:109-117.

Leeson TS., Leeson CR., Paparo AA. *Texto/atlas de histología*. Ed. Interamericana Mc Graw Hill; p. 363-380. 1990.

Lemarchand C., Couvreur P., Vauthier C., Constatini D., Gref R. Study of emulsion by graft copolymers using teh optical analyzer Turbiscan. *Int. J. Pharm.* 2003;254:77-82.

Li NN. Separating hydrocarbons with liquid membranes. US patent 3 410 794. 1968.

Liebowitz i cols. Referència a: Fox C. *Technically Speaking*. *Cosm. Toil.* 1996;111:19-21.

Logu AD., Fadda AM., Anchisi C., Maccioni AM., Sinico C., Schivo ML., et al. Effects of in-Vitro Activity of Miconazole and Ketoconazole in Phospholipid Formulations. *J. Antimicrob. Chem.* 1997;40(6):889-893.

Lubrizol Corporation. *Bioadhesion*. Technical Bulletin 23. 2011.

## M

Maheshwari RGS., Tekade RK., Sharma PA., Darwhekar G., Tyagi A., Patel RP., et al. Ethosomes and Ultradeformable Liposomes for Transdermal Delivery of Clotrimazole: A Comparative Assessment. *Saudi Pharmaceutical Journal.* 2012;20(2):161-170.

Maibach H. *Dermatological formulations: Percutaneous absorption*. By Brian W. Barry, Marcel Dekker. 1984.

Malvern Instruments Ltd. *Mastersizer, User Manual*. Worcestershire. UK. 2007.

Mariné Mestrés M. *Desenvolupament experimental de nous tractaments Antifúngics per Infeccions causades per Llevats*. Universitat Rovira i Virgili. ISBN:978-84-693-4593-1. 2010.

Mathot F., Schanck A., Van Bambeke F., Ariën A., Noppe M., Brewster, M., et al. Passive diffusion of polymeric surfactants across lipid bilayers. *J. Control. Rel.* 2007;120:79-87.

Matsumoto S., Kita Y., Yonezawa D., An attempt at preparing water-in-oil-in water multiple-phase emulsions. *Journal of Colloid and Interface Science.* 1976;57:353-361.

Matsumoto S., Koh Y., Michiura A. Preparation of W/O/W emulsions in an edible form on the basis of phase inversion technique. *J. Dispersion Sci. Technol.* 1985;6:507-521.

Matsumoto S., Sherman P. A preliminary study of w/o/w emulsions with a view to possible food applications. *J. Texture Studies.* 1981;12:243-257.

Mediavilla A., Peralta G. Flórez J. *Capítulo 67: Farmacos Antifúngicos*. A Flórez J. *Farmacología Humana*. 6ª edición. Barcelona: Elsevier España; 2014. p.1055-1067.

Mengual O., Meunier G., Cayre I., Puech K., Snabre P. Characterisation of instability of concentrated dispersions by a new optical analyser: the TURBISCAN MA 1000. *Colloids Surf. A: Physicochem. Eng. Aspects*. 1999;152:111-123.

Menzel E., Golbery S. Ph effect of the percutaneous penetration of lignocaine hydrochloride. *Dermatologica*. 1978;156:8-14.

Michaels AS, Chandrasekaran SK, Shaw JE. Drug permeation through human skin: Theory and invitro experimental measurement. *AIChE Journal*. 1975;21:985-996.

Middaugh CR. Biophysical approaches to the pharmaceutical development of proteins. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 1990;16:2635-2654.

Mitchell TG. *Microbiología Médica*. A: Brooks GF., Carroll KC., Butel JS., Morse SA., Mietzner TA. (eds.): Jawetz, Melnick & Adelberg's medical microbiology. 25ª Edición. New York: Lange Medical Books/McGraw-Hill; 2010. p. 625-629.

Mohammed D., Matts PJ., Hadgraft J., Lane ME. *In Vitro–In Vivo* Correlation in Skin Permeation. *Pharm. Res*. 2014;31:394-400.

Molina de Diego, A. Aspectos clínicos, diagnósticos y terapéuticos de las dermatofitosis. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin*. 2011;29(3):33-39.

Monzón A, Cuenca-Estrella M, Rodríguez-Tudela JL. Estudio epidemiológico sobre las dermatofitosis en España (abril-junio 2001). *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2003;21(9):477-83.

Morral Ruíz G. Tesis Doctoral: Estudi de la formació de Nanopartícules polimèriques obtingudes a partir de nanoemulsions de fase externa aquosa i associació d'antiinflamatoris no esteroïdals. Universitat de Barcelona. 2011.

Morris-Jones R. Sporotrichosis. *Clin. Exp. Dermatol*. 2002;27:427-431.

Muguet V., Seiller M., Barratt G., Ozer O., Marty JP., Grossiord JL. Formulation of shear rate sensitive multiple emulsions. *J. Control. Release*. 2001;70(1-2):37-49.

Mukherjee S., Ray S., Thakur R.S. Design and Evaluation of Itraconazole Loaded Solid Lipid Nanoparticulate System for Improving the Antifungal Therapy. *Pakistan J. Pharm. Sci*. 2009;22(2):131-138.

Murray PR., Rosenthal KS., Kobayashi GS., Pfaller M.A. *Microbiología médica*. 7.ª edición. Elsevier España. p. 605-714. 2014.

Muscholik G. Multiple emulsions for food use. *Curr. Opin. Coll. Int. Sci*. 2007;12:213-220.

## N

Nakhare S., Vyas S.P. Prolonged release multiple emulsion based system bearing rifampicin: *in vitro* characterisation. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 1995;21(7):869-878.

Nguyen HX., Puri A., Banga AK. Methods to simulate rubbing of topical formulation for *in vitro* skin permeation studies. *Int. J. Pharm.* 2017;19:22-33.

Nielsen PG. Die Bedeutung des Vehikels in der Behandlung der Dermatophyten-Infektionen der hereditären palmo-plantaren Keratodermien. *Mycoses*. 1984;27:227-230.

Nohynek G, Shaefer H. Benefit and risk of organic ultraviolet filters. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. 2001;33:285-299.

## O

Okochi H., Nakano M. Preparation and evaluation of w/o/w type emulsions containing vancomycin. *Advanced Drug Del. Rev.* 2000;45:5-26.

Olivieri L., Seiller M., Bromberg L., Besnard M., Duong TN., Grossiord JL. Optimization of a thermally reversible W/O/W multiple emulsion for shear-induced drug release. *J. Control. Release*. 2003;88:401-412.

Omotosho JA., Law TK., Whateley TL., Florence AT. The stabilization of W/O/W emulsions by interfacial interaction between Albumin and Nonionic surfactants. *Colloids Surf.* 1986;20:133-144.

Owusu RK., Zhu Q., Dickinson E. Controlled release of L-tryptophan and vitamin B2 from model water/oil/water multiple emulsions. *Food Hydrocolloids*. 1992;6:443-453 .

Ozcan I., Abaci O., Uztan AH., Aksu B., Boyacıoğlu H., Güneri T., et al. Enhanced Topical Delivery of Terbinafine Hydrochloride with Chitosan Hydrogels. *AAPS Pharmaceutical Science Technology*. 2009;10(3):1024-1031.

## P

Pal R. Effect of droplet size on the rheology of emulsions. *AIChE J.* 1996;42:3181-3190.

Pal R. Rheology of simple and multiple emulsions. *Curr. Opin. Colloid Interf. Sci.* 2011;16:41-60.

Palmer BC. , DeLouise LA. Nanoparticle-Enabled Transdermal Drug Delivery Systems for Enhanced Dose Control and Tissue Targeting. *Molecules*. 2016;21:1719.

Panchal CJ., Zajic JE., Gerson DF. Multiple-phase emulsions using microbial emulsifiers. *J. Colloid. Inter. Sci.* 1979;68(2):295-307.

Pandit J., Garg M., Jain NK. Miconazole nitrate bearing ultraflexible liposomes for the treatment of fungal infection. *J. Liposome Res.* 2014;24:163-169.

Passerini N., Gavini E., Albertini B., Rassa G., Di Sabatino M., Sanna V., et al. Evaluation of Solid Lipid Microparticles Produced by Spray Congealing for Topical Application of Econazole Nitrate. *J. Pharm. Pharmacol.* 2009;61(5):559-567.

Patel MR., Patel RB., Parikh JR., Solanki AB., et al. Investigating Effect of Microemulsion Components: *In vitro* Permeation of Ketoconazole. *Pharm. Develop. Tech.* 2011;16(3):250-258.

Patel MR., Patel RB., Parikh JR., Solanki AB., Patel BG. Effect of Formulation Components on the *in Vitro* Permeation of Microemulsion Drug Delivery System of Fluconazole. *AAPS PharmSci. Tech.* 2009a;10(3):917-923.

Patel PR., Patel HH., Baria HA. Formulation and evaluation of carbopol gel containing liposomes of ketoconazole. *Int. J. Drug Deliv. Technol.* 2009b;1:42-45.

Patzschke K., Ritter W., Siefert HM., Weber H., Wegner LA. Pharmacokinetic studies following systemic and topical administration of [<sup>14</sup>C]-Bifonazole in Man. *Arzneimittelforschung*. 1983;33(5):745-750.



Peira E., Carlotti ME., Trotta C., Cavalli R., Trotta M. Positively Charged Microemulsions for Topical Application. *International Journal of Pharmacy*. 2008;346(1-2):119-123.

Pena LE, Lee BI, Sternes JF. Structural rheology of model ointment. *Pharm Res*. 1994;11:875-881.

Peschka M., Roberts PH., Knepper TP. Analysis, fate studies and monitoring of the antifungal agent clotrimazole in the aquatic environment. *Anal Bioanal Chem*. 2007;389:959-968.

Piemi MP., Korner D., Benita S., Marty JP. Positively and Negatively Charged Submicron Emulsions for Enhanced Topical Delivery of Antifungal Drugs. *J. Control. Rel*. 1999;58(2):177-187.

Plempel M., Regel E., Büchel KH. Antimycotic efficacy of Bifonazole *in vitro* and *in vivo*. *Arzneim-Forsch*. 1983;33(4):517-524.

Plempel, M., D. Berg, J. Abbink. Antimycotic characteristics of bifonazole. In R. A. Fromtling (ed.), *Recent trends in the discovery, development and evaluation of antifungal agents*. J. R. Prous Publishers, Barcelona; 1987. p.287-312.

Polak, A. Antifungal activity of four antifungal drugs in the cutaneous retention time test. *Sabouraudia. J. Med. Vet. Mycol*. 1984;22:501-503.

Popović G., Čakar M., Agbaba D. Determination of bifonazole in creams containing methyl- and propyl p-hydroxybenzoate by derivative spectrophotometric method. *J. Pharm. Biomed. Anal*. 2003;33(1):131–136.

Puig L., Vilarrassa E. Tiña interdigital de los pies (pie de atleta): su diagnóstico y últimos avances en su tratamiento. *Comisión de Formación Continuada. Sistema Nacional de Salud. Sanidad y Ediciones. España*. 2008.

## Q

Quatresooz P, Piérard-Franchimont C, Arrese JE, Piérard GE. Clinico pathologic presentations of dermatomycoses in cancer patients. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol*. 2008;22:907-917.

## R

Raab WPE. *The Treatment of Mycosis with Imidazole Derivatives*. Berlin. Springer-Verlag. 1980.

Raynal S. Chapter 13. Applications of Multiple Emulsions in the food industry. A Grossiord JL., Seiller M., eds. *Multiple Emulsion: Structure, Properties and Applications*. Paris: Editions de Santé;1998. p.349-372.

Raynal S., Grossiord JL., Seiller M. i cols. A topical w/o/w multiple emulsion containing several active substances: formulation, characterization and study of release. *J. Controll. Rel*. 1993;26(2):129-140.

Ritschel AW, Hussain AS. The principles of permeation of substances across the skin. *Meth. Find Esptl. Clin. Pharmacol*. 1988;10:39-56.

Ritschel AW. *Applied biopharmaceutics II*. University of Cincinnati. USA; 1971. p. 1229-1244.

Ritter W., Siefert H.Mm. Biological disposition and percutaneous absorption of bifonazole in animals and man. A R. A. Fromtling (ed.), *Recent trends in the discovery, development and evaluation of antifungal agents*. J. R. Prous Publishers, Barcelona; 1987. p. 383-405.

Robinson HJ., Phares HF., Graessle OE. Antimycotic properties of thiabendazole. *J. Invest. Dermatol*. 1964;42:479-482.

Rocha-Filho PA., Vaution C., Seiller M. Les émulsions multiples L/H/L. STP Pharma Sci. 1989;5(10):652-660.

Rodriguez-Tudela JL, Arendrup MC, Barchiesi F, i cols. 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.

Rubio M., Gil J., Benito R., Ramírez I., Navarro M. Micosis más frecuentes en nuestro medio. A: Guía práctica de identificación y diagnóstico en micología clínica. Eds: Pemán J, Martín E, Rubio M. Rev. Iberoam. Micol. Bilbao, País Vasco, España. 2001.

## S

Sahoo S, Pani NR, Sahoo SK. Microemulsion based topical hydrogel of sertaconazole: Formulation, characterization and evaluation. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. 2014;120:193-199.

Sahoo S., Pani NR., Sahoo SK. Effect of microemulsion in topical sertaconazole hydrogel: *In vitro* and *in vivo* study. Drug Deliv. 2014;20:1-8.

Salerno C., Carlucci AM., Bregni C. Study of *in Vitro* Drug Release and Percutaneous Absorption of Fluconazole from Topical Dosage Forms. AAPS Pharmaceutical Science Technology. 2010;11(2):986-993.

Salimi A., Hedayatipour N., Moghimipour E. The Effect of Various Vehicles on the Naproxen Permeability through Rat Skin: A Mechanistic Study by DSC and FT-IR Techniques. Adv. Pharm. Bull. 2016;6(1):9-16.

Sanna V., Gavini E., Cossu M., Rassu G., Giunchedi P. Solid Lipid Nanoparticles (SLN) as Carriers for the Topical Delivery of Econazole Nitrate: In-Vitro Characterization, ex-Vivo and in-Vivo Studies. J. Pharm. Pharmacol. 2007;59(8):1057-1064.

Schaefer H., Filaquier C. Skin metabolism. Pathologie-Biologie. 1992;40(2):196-204.

Schaller M., Preidel H., Januschke E., Korting HC. Light and Electron Microscopic Findings in a Model of Human Cutaneous Candidosis Based on Reconstructed Human Epidermis Following the Topical Application of Different Econazole Formulations. Journal of Drug Targeting. 1999;6(5): 361-372.

Scheuplein RJ. Mechanism of percutaneous absorption II. Transient diffusion and the relative importance of various routes of skin penetration. J. Invest. Dermatol. 1967;48:79-88.

Schmidts T., Dobler D., Schlupp P., Nissing C., Garn H., Runkel F. Development of multiple W/O/W emulsions as dermal carrier system for oligonucleotides: effect of additives on emulsion stability. Int. J. Pharm. 2010;398(1-2):107-113.

Schramm G. A practical approach to rheology and rheometry. 2<sup>a</sup> edició. Thermo Electron (Karlsruhe) GmbH. 1994. p. 83-86;93-133.

Schwartz RA. Superficial fungal infections. Lancet. 2004;364(9440):1173-1182.

Schwarz JC., Kählig H., Matsko NB., Kratzel M., Husa M., Valenta C. Decrease of Liposomal Size and Retarding Effect on Fluconazole Skin Permeation by Lysine Derivatives. Journal of Pharmaceutical Science. 2011;100(7): 2911-2919.

Seeliger HPR. Pilzemmende Wirkung eines neuen Benzimidazol Derivatives. Mykosen. 1958;1:162-171.

Seifriz W. Studies in emulsion III. Double reversal of oil emulsions occasioned by the same electrolyte. J. Phys. Chem. 1925;29:738.

Seiller M., Grossiord JL., Silva Cunha A. Chapter 2. Obtaining multiple emulsions. A Grossiord JL., Seiller M., eds. Multiple Emulsion: Structure, Properties and Applications. Paris: Editions de Santé; 1998. p. 55-80.

Seiller M., Vaution C., de Luca M. Contribution à la connaissance des émulsions multiples. Bulletin Technique Gattefossé; 1987. 80:27-32.

Seiller M., Vaution C., Grossiord JL. Émulsions multiples.applications topiques.Formes pharmaceutiques pour application locale. Capítol 18. Lavoisier TEC&DOC; 1996. p. 458-480.

Shaikh KS., Chellampillai B., Pawar AP. Studies on Nonionic Surfactant Bilayer Vesicles of Cicloprox Olamine. Drug Dev. Ind. Pharm. 2010;36(8):946-953.

Shalaeva M., Kenseth J., Lombard F., Batin A. Measurement of dissociation constants (pKa Values) of organic compounds by multiplexed capillary electrophoresis using aqueous and cosolvent buffers. J. Pharm. Sci. 2008;97(7):2581-2606.

Sharma R., Pathak K. Polymeric Nanosponges as an Alternative Carrier for Improved Retention of Econazole Nitrate onto the Skin through Topical Hydrogel Formulation. Pharmac. Dev.Tech. 2011;16(4):367-376.

Shaw JE., Prevo M., Sale R., Yum S. Physiology biochemistry and molecular biology of skin. Lowell A. Goldsmith. ed. Univ. Press Oxford. 1991. Cap 55. p. 1447-1475.

Sheppard E, Tcheurekdjan N. Comments on multiple phase emulsion. J. Colloid Inter. Sci. 1977;62(3): 564-565.

Sherman P., Parkinson C. Measurement of phase inversion temperature above 100°C. Prog. Colloid and Polymer Sci. 1978;63:10-11.

Shirsand S., Para M., Nagendrakumar D., Kanani K., Keerthy D. Formulation and evaluation of ketoconazole niosomal gel drug delivery system. Int. J. Pharm. Investig. 2012;2:201-207.

Silva AC., Amaral MH., González-Mira E., Santos D., Ferreira D. Solid lipid nanoparticles (SLN) - based hydrogels as potential carriers for oral transmucosal delivery of Risperidone: Preparation and characterization studies. Colloids and surfaces B: Biointerfaces. 2012;93:241-248.

Silva Cunha A., Grossiord JL., Puisieux F., Seiller M. W/O/W multiple emulsions of insulin containing a protease inhibitor and an absorption enhancer: preparation, characterization and determination of stability towards proteases *in vitro*. Int. J. Pharm. 1997;158:79-89.

Silva MR., Contente DML., Oliveira A., Rocha-Filho A. Ascorbic acid liberation from O/W/O multiple emulsions. Cosm. Toil. 1997;112:85-87.

Smith KJ., Neafie RC., Skelton HG., Barrett TL., Graham JH., Lupton GP. Majocchi's granuloma. J. Cutan. Pathol. 1991;18:28-35.

Smits J., Weibel M., Herbst N. Hydro-Gain®. Un Sistema humectante de origen vegetal que estimula la hidratación de la piel y fortalece la barrera lipídica. Noticias de Cosmética y Perfumería (NCP). 2015;342: 16-24.

SmPC Canesmycospor®. Bayer Hispania SL. Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios. Revised on 02/2015.

Sobue S., Sekiguchi K. Difference in Percutaneous Absorption and Intracutaneous Distribution in Guinea Pigs among Topical Antifungal Drugs (Tioconazole Solution, Tioconazole Cream, Miconazole Nitrate Solution and Bifonazole Solution). *Biol. Pharm. Bull.* 2004; 27(9):1428-1432.

Song CK., Balakrishnan P., Shim CK., Chung SJ., Chong S., Kim DD. A Novel Vesicular Carrier, Transethosome, for Enhanced Skin Delivery of Voriconazole: Characterization and in Vitro/in Vivo Evaluation. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces.* 2012;92:299-304.

Souto EB., Wissing SA., Barbosa CM., Müller RH. Development of a controlled release formulation based on SLN and NLC for topical clotrimazole delivery. *Int J Pharm* 2004;278:71-77.

Sudhakar B., Varma JN., Murthy KV. Formulation, characterization and ex vivo studies of terbinafine HCl liposomes for cutaneous delivery. *Curr. Drug Deliv.* 2014;11:521-530.

Suñer J., Boix A., Halbaut L., Velázquez N., Zamarbide J., Bozal-de-Febrer N., et al. Skin permeation of econazole nitrate formulated in an enhanced hydrophilic multiple emulsion. *Mycoses.* 2017b;60(3):166-177.

Suñer J., Calpena AC., Clares B., Cañadas C., Halbaut L. Development of clotrimazole multiple W/O/W emulsions as vehicles for drug delivery: effects of additives on emulsion stability. *AAPS PharmSciTech.* 2017a;60(3):166-177.

Suñer J., Calpena AC., Velazquez N., Saleh EA., Halbaut L. Preformulation of a multiple emulsion as a vehicle for clotrimazole delivery. Lisbon: 9th World Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology. 2014.

Suñer-Carbó J. Emulsions Múltiples A/O/A d'aplicació Tòpica. Màster Experimental en Ciències Farmacèutiques. Universitat de Barcelona. 1998.

## T

Tadros T. *Emulsions Science and Technology.* Wiley-VCH. Weinheim. 2009.

Tang SY., Sivakumar M., Ng AMH., Shridharan P. Anti-inflammatory and analgesic activity of novel oral aspirin-loaded nanoemulsion and nano multiple emulsion formulations generated using ultrasound cavitation. *Int. J. Pharm.* 2012;430:299-306.

Taplin D. Superficial mycoses. *The Journal of Investigative Dermatology.* 1976;67(1):177-181.

Tauber U., Rzadkiewicz M. Bioavailability of isoconazole in the skin. *Mykosen.* 1979;22:201-216.

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

Taylor P. Ostwald ripening in emulsions. *Adv. Colloid Int. Sci.* 1998;75:107-163.

Taylor P. Ostwald ripening in emulsions. *Colloid and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects.* 1995;99:175-185.

Tedajo GM., Seiller M., Prognon P., Grossiord JL. pH compartmented w/o/w multiple emulsion: a diffusion study. *J. Control. Rel.* 2001;75(1-2):45-53.

Tirnaksiz F., Kalsin O. A topical w/o/w multiple emulsions prepared with Tetronic 908 as a hydrophilic surfactant: formulation, characterization and release study. *J. Pharma. Pharm. Sci.* 2005;8:299-315.

Tokgoz NS., Yoenang Piemi MP., Prognon, Fructus AE., Grossiord JL., Seiller M. Evaluation in vitro de la vitamine C sur la peau de rat hairless. Influence de la nature du vehicle. Proceedings of the 1th Congreso Mediterráneo de Cosmetología. La grande Hotte, Montpellier, France. 1996.

Tortora GJ., Derrickson B. Principles of anatomy and physiology. The integumentary system. 14 Ed. USA: Willey; 2014; USA;5:142-168.

Tosti A., Guerra L., Morelli R., Barda F. Prevalence and sources of sensitization to emulsifiers: a clinical study. *Contact. Dermatitis.* 1990;23:68-72.

Tregear RT. Molecular movement. The permeability of skin. A: Physical Functions of Skin. New York: Academic Press Inc; 1966. p. 1-52.

#### U

Ursica L., Tita D., Palici I., Tita B., Vlaia V. Particle size analysis of some water/oil/water multiple emulsions. *J. Pharm. Biom. Anal.* 2005;37:931-936.

#### V

Vaghasiya H., Kumar A., Sawant K. Development of solid lipidnanoparticles based controlled release system for topical delivery of terbinafine hydrochloride. *Eur. J. Pharm. Sci.* 2013;49:311-322.

Valenta C., Schultz K. Influence of carrageenan on the rheology and skin permeation of microemulsion formulations. *J. Control. Rel.* 2004;95(2):257-265.

Vanden Bossche H. Biochemical effects of miconazole on fungi. *Biochem. Pharmacol.* 1974;23:887-899.

Vasiljevic D., Vuleta G., Primorac M. The characterization of the semi-solid W/O/W emulsions with low concentrations of the primary polymeric emulsifier. *Int. J. Cosm. Sci.* 2005;7:81-87.

Vázquez-González ML., Bernad R., Calpena AC., Domènech O., Montero MT., Hernández-Borrell J. Improving ex vivo skin permeation of non-steroidal anti-inflammatory drugs: Enhancing extemporaneous transformation of liposomes into planar lipid bilayers. *Int. J. Pharmac.* 2014;461:427-436.

Venus M., Waterman J. McNab I. Basic physiology of the skin. *Surgery.* 2011;29(10):471-474.

Veraldi S. Isoconazole nitrate: a unique broad-spectrum antimicrobial azole effective in the treatment of dermatomycoses, both as monotherapy and in combination with corticosteroids. *Mycoses.* 2013;56(Suppl 1):3-15.

Verma ML., Palani S. Development and in vitro evaluation of liposomal gel of ciclopirox olamine. *Int. J. Pharma. Bio. Sci.* 2010;1:1-6.

Verma P., Pathak K. Nanosized ethanolic vesicles loaded with conazole nitrate for the treatment of deep fungal infection through topical gel formulation. *Nanomedicine: Nanotechnol Biol Medicine.* 2012;8:489-496.

#### W

Walters KA., Watkinson AC., Brain KR. *In vitro* skin permeation evaluation: the only realistic option. *Int. J. Cosm. Sci.* 1998;20:307-316.

Wen L., Papadopoulos KD. Effects of osmotic pressure on water transport in W/O/W emulsions. J. Coll. Int. Sci. 2001;235:398-404.

Whittaker RH. New concepts of kingdoms of organisms. Evolutionary relations are better represented by new classifications than by the traditional two kingdoms. Science. 1969;163:150-60.

Williams AC., Barry BW. Penetration enhancers. Adv. Drug Deliv. Rev. 2004;56:603-618

Williams AC., Barry BW. Skin absorption enhancers. Critical Reviews Therapeutic Drug Carrier Systems. 1992;9(3-4):305-312.

Williams AC., Cornwell PA., Barry BW. On the non-gaussian distribution of human skin permeabilities. Int. J. Pharm. 1992;86:69-72.

Williams ML., Hincenbergs M., Holbrook KA. Skin lipid content during early fetal development. J. Invest. Derm. 1988;91:263-268.

Wolff K., Johnson RA., Saavedra AP. Atlas de Dermatología Clínica. Fitzpatrick 7ª Ed. México: Mc Graw-Hill; 2014.

Woolley, D. W. Some biological effects produced by benzimidazole and their reversal by purines. J. Biol. Chem. 1944;152:225-232.

#### Y

Yamaoka K., Makaowa T., Uno T. Application of *Akaike's* information criteria (AIC) in the evaluation of linear pharmacokinetics equation. J. Pharmacokinetic Biopharm. 1978;6:165-179.

Yang JH., Kim YI., Kim KM. Preparation and evaluation of aceclofenac microemulsion for transdermal delivery system. Arch. Pharm. Res. 2002;25(4):534-540.

#### Z

Zhao XY., Cao Q., Zheng LQ., Zhang GY. Rheological Properties and Microstructures of Gelatin Containing Microemulsion-Based Organogels. Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects. 2006;281(1):67-73.



## ANNEX: ALTRES MÈRITS

---





## Comunicacions en forma de pòster:

- **Suñer Carbó J.**, Calpena AC., Velazquez N., Saleh EA., Halbaut L. Preformulation of a multiple emulsion as a vehicle for clotrimazole delivery. 9th World Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology. March 2014, Lisbon, Portugal.
- **Suñer J.**, Cañadas C., Halbaut L., Calpena AC. Human Skin Permeation and Retention of a New Multiple Emulsion versus commercial reference. Skin Forum Annual Meeting 2014. 4-5 September 2014. Prague, Czech Republic.
- **Suñer Carbó, Joaquim**; Cañadas Enrich, Cristina; Halbaut Bellowa, Lyda; Calpena Company, Ana; Silvia Baladron, Cristina; Andrade Carrera, Berenice. Estudio de liberación de una nueva emulsión múltiple de Clotrimazol versus la fórmula de referencia. XLVII Congreso Nacional de Ciencias Farmacéuticas. Puerto Vallarta 26-29 octubre de 2014. Mèxic.
- Cristina Cañadas, **Joaquim Suñer**, Nelvis Velázquez, Ana Cristina Calpena, Lyda Halbaut. Influencia de la fase oleosa en una emulsión múltiple A/O/A de clotrimazol. XII Congreso de la Sociedad Española De Farmacia Industrial y Galénica (SEFIG). Barcelona, 26-28 enero de 2015.
- **Joaquim Suñer**, Cristina Cañadas, Ana Cristina Calpena, Lyda Halbaut. Emulsion múltiple A/O/A de clotrimazol: caracterización y estabilidad. XII Congreso de la Sociedad Española De Farmacia Industrial y Galénica (SEFIG). Barcelona, 26-28 enero de 2015.
- **Suñer Carbó J.**, Calpena A.C., Zammarbide J.; Barbolini E.; Halbaut L., Boix Montañés A. Preformulation and characterization of a novel multiple emulsion as a vehicle for bifonazole delivery. 10th World Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology. 4-7 april 2016, Glasgow, Scotland, UK.
- A. Boix-Montañés, A. Calpena-Campany, N. Velázquez-Carralero, C. Cañadas-Enrich, L. Halbaut-Bellbelloowa, **J. Suñer-Carbó**. *In Vitro* drug release and characterization of a novel econazole Multiple Emulsion versus commercial formulation. 10th World Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology. 4-7 april 2016, Glasgow, Scotland, UK.

## COMUNICACIONS EN FORMA DE POSTER









































