



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR

TESIS DE DOCTORADO EN QUÍMICA

**DISEÑO Y DESARROLLO DE MICROEMULSIONES
CON APLICACIONES BIOMÉDICAS**

ANTONELA RITA MONTEFUSCOLI

BAHÍA BLANCA

ARGENTINA

2019

PREFACIO

“Esta Tesis se presenta como parte de los requisitos para optar al grado Académico de Doctor en Química, de la Universidad Nacional del Sur y no ha sido presentada previamente para la obtención de otro título en esta Universidad u otra. La misma contiene los resultados obtenidos en investigaciones llevadas a cabo en el Instituto de Química del Sur (INQUISUR-CONICET) dependiente del Departamento de Química de la Universidad Nacional del Sur y en la Unidad de Investigación y Desarrollo en Tecnología Farmacéutica (UNITEFA-CONICET) dependiente del Departamento de Ciencias Farmacéuticas de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Nacional de Córdoba, durante el período comprendido entre el 07 de septiembre de 2010 y el 11 de diciembre de 2019, bajo la Dirección de los Dres. Beatriz Susana Fernández Band ex Profesora Titular del Departamento de Química Analítica de la Universidad Nacional del Sur e Investigadora Principal de CONICET y Santiago Daniel Palma, Profesor Asociado del Departamento de Ciencias Farmacéuticas de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Nacional de Córdoba e Investigador Principal de CONICET”.

Farm. Montefuscoli Antonela Rita



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR
Secretaría General de Posgrado y Educación Continua

La presente tesis ha sido aprobada el.../.../....., mereciendo la calificación de(.....).

A mi esposo Andrés
A mis padres Sergio y Liliana
A mi hermano Mauro
A todos los que fueron parte
Y a ella... que viene en camino.... Renata

RESUMEN

Las microemulsiones son dispersiones transparentes y termodinámicamente estables de dos fases inmiscibles entre sí que contienen cantidades apropiadas de tensioactivos y cosurfactantes, dando lugar a gotas de tamaño entre 10-100 nm.

Tienen potencial aplicación como vehículos portadores de fármacos que presentan limitaciones debido a su baja solubilidad en agua, toxicidad o dificultad de permeación. Otras ventajas son: vida útil prolongada, aumento de solubilidad de moléculas hidrófilas y lipófilas, esterilización por filtración, liberación controlada de principios activos.

En el presente trabajo de tesis se abordaron tres aplicaciones diferentes para las microemulsiones.

POTENCIAL APLICACIÓN DE LAS MICROEMULSIONES DISEÑADAS SISTEMA PORTADOR DE FÁRMACOS A NIVEL OCULAR

Acetazolamida (ACZ) es el inhibidor oral de la anhidrasa carbónica comúnmente utilizado en el tratamiento de glaucoma. Para obtener una disminución deseada de la presión intraocular deben emplearse grandes dosis orales de ACZ. Esto resulta en una amplia gama de efectos secundarios que podrían evitarse con el uso tópico del fármaco. Sin embargo, la escasa solubilidad acuosa y la baja permeabilidad corneal de ACZ limitan su biodisponibilidad a nivel ocular.

Uno de los principales objetivos de esta tesis fué formular una microemulsión ocular de ACZ de alta eficacia terapéutica y efecto prolongado.

Se prepararon tres sistemas aceite / agua, basados en geranio, geraniol, aceite esencial de citronella (fase oleosa), Cremophor El, Brij 35 y Tween 80 como tensioactivos.

Se construyeron los correspondientes diagramas de fase pseudoternarios.

La microemulsión basada en citronella mostró propiedades fisicoquímicas aceptables.

Para todas las preparaciones se aplicó una versión modificada de la prueba de irritación ocular Draize que reveló que la fórmula de Citronella no era irritante.

La evaluación biológica de las fórmulas comerciales y de la microemulsión en conejos albinos normotensos, nos orientó a seleccionar la formulación anteriormente mencionada basándonos en una eficacia terapéutica similar a dosis más bajas y un efecto más prolongado respecto de los productos convencionales, ofreciendo un tratamiento más intensivo del glaucoma.

SISTEMAS AUTOCONSERVABLES

Si bien los conservantes se agregan a los productos farmacéuticos para inhibir el crecimiento de microorganismos peligrosos, en formulas oftálmicas generan efectos indeseables.

Se ha sugerido que las microemulsiones podrían autopreservarse. Asimismo, como los aceites esenciales son conocidos por sus propiedades antibacterianas, la hipótesis de trabajo estuvo orientada a verificar si la microemulsión de citronella tenía propiedades conservantes.

Los resultados indicaron que el sistema inhibió el crecimiento de *Staphylococcus aureus*, *Mycobacterium gordonae*, *Candida albicans* pero no el de *Pseudomonas aeruginosa*, por lo que la formula no es capaz de autopreservarse.

CONTROL DE MOSQUITOS

Las microemulsiones son atractivas como posibles productos insecticidas debido a la alta biodisponibilidad de las gotas de aceites esenciales larvicidas, atribuible al reducido tamaño particular.

Se realizó un estudio para comparar el efecto biológico de la emulsión y la microemulsión o/w de aceite esencial de geranio y geraniol, sobre larvas de mosquito *Culex pipiens pipiens*.

Los sistemas microemulsificados basados en geranio y los de geraniol produjeron un aumento notable de la actividad larvicida en comparación con las emulsiones correspondientes, siendo las nanoformulaciones basadas en geraniol más efectivas que las basadas en geranio. Sin embargo, se prefieren las microemulsiones de geranio debido a sus perfiles toxicológicos residuales. Estos sistemas podrían usarse en un programa de manejo integrado de plagas para *Culex pipiens pipiens*.

ABSTRACT

The microemulsions are clear and thermodynamically stable dispersions of immiscible phases containing appropriate amounts of surfactants and cosurfactants, forming small droplets with diameters between 10 and 100 nm. They have potential use as delivery systems for many pharmaceuticals which are normally of limited use due to their low aqueous solubility, toxicity or low permeation. Other advantages are: extended shelf life, compatibility with hydrophilic and lipophilic drug molecules, ability to be sterilized by filtration, control of drug release.

Three different applications of microemulsions were approached in this work of Thesis.

POTENTIAL APPLICATION OF THE DESIGNED MICROEMULSIONS OCULAR DRUG DELIVERY SYSTEM:

Acetazolamide (ACZ) is the most commonly oral anhydrase carbonic inhibitor used in the treatment of Glaucoma. To obtain the desired lowering of intraocular pressure, large oral doses of ACZ are used resulting in a wide array of side effects. Side effects of ACZ could be avoided if ACZ was topically administered into the eyes. However, poor aqueous solubility and low corneal permeability of the drug limits its ocular bioavailability.

The main objective of this work was to formulate an ACZ ocular microemulsion of high therapeutic efficacy and prolonged effect. Three oil/water systems, consisting of geranium, geraniol, and Citronella essential oils and Cremophor EI, Brij 35 and Tween 80 as surfactants, were prepared and their pseudoternary-phase diagrams were obtained.

Microemulsion made of Citronella, showed acceptable physicochemical properties.

A modified version of Draize rabbit eye irritation test was carried out for all of the preparations and revealed citronella formulation was nonirritant.

Biological evaluation of the microemulsion and commercial formulations on normotensive albino rabbits orientated us to select the microemulsion mentioned previously that it was the most effective, having a similar therapeutic efficacy, with a

lower dose, and longer effect relative to a market product, offering more intensive treatment of glaucoma, compared to conventional eye drops.

SELF PRESERVING SYSTEMS

Antimicrobial preservatives are added to pharmaceuticals to inhibit the growth of dangerous microorganisms. However, the presence preservatives in ocular medications has undesirable effects.

It has been suggested that microemulsions are self-preserving antimicrobials.

As essential oils are known for their antimicrobial properties, the hypothesis of our work was testing if citronella microemulsion acts as a self-preserving system. The results indicated that citronella microemulsion inhibited the growth of *Staphylococcus aureus*, *Mycobacterium gordonae*, *Candida albicans* but not *Pseudomonas aeruginosa*, so the system could not be considered as a self-preserved one.

MOSQUITO CONTROL

Microemulsions are attractive as potential insecticidal products due to high bioviability of the larvicidal essential oil drops, attributable to their small size.

A laboratory study was conducted in order to compare the biological effect of emulsion and microemulsion of geranium and geraniol essential oils in water against *Culex pipiens pipiens* mosquito larvae.

Microemulsified systems based on geranium and those on geraniol produced a notable increase of the larvicidal activity when compared with the corresponding emulsions, being nanoformulations based on geraniol more effective than geranium based ones. However, geranium microemulsions are preferred due to their residual toxicological profiles.

The results indicate that these novel systems could be used in integrated pest management program for the *Culex pipiens pipiens*.

Certifico que fueron incluidos los cambios y correcciones sugeridos por los jurados

.....

Firma del Director

ÍNDICE

PREFACIO	2
RESUMEN	4
POTENCIAL APLICACIÓN DE LAS MICROEMULSIONES DISEÑADAS	4
SISTEMA PORTADOR DE FÁRMACOS A NIVEL OCULAR	4
SISTEMAS AUTOCONSERVABLES	5
CONTROL DE MOSQUITOS	5
ABSTRACT	6
POTENTIAL APPLICATION OF THE DESIGNED MICROEMULSIONS	6
OCULAR DRUG DELIVERY SYSTEM	6
SELF PRESERVING SYSTEMS	7
MOSQUITO CONTROL	7
ÍNDICE	9
DISEÑO Y DESARROLLO DE MICROEMULSIONES CON APLICACIONES BIOMÉDICAS	13
INTRODUCCIÓN GENERAL	14
BIBLIOGRAFÍA	18
CAPÍTULO I: DISEÑO DE MICROEMULSIONES	20
INTRODUCCIÓN	21
GENERALIDADES	21
SURFACTANTES	22
ACTIVIDAD SUPERFICIAL DE LOS SURFACTANTES	22
OTROS SISTEMAS FORMADOS POR LOS SURFACTANTES	25
MICROEMULSIONES, MACROEMULSIONES Y SISTEMAS MICELARES: CARACTERÍSTICAS	27
TERMINOLOGÍA Y DEFINICIÓN DE LAS MICROEMULSIONES	28
PRINCIPIOS BÁSICOS DE LA FORMACIÓN DE MICROEMULSIONES	28
TEORÍA TERMODINÁMICA	28
TEORÍA DE LOS FILMS MIXTOS	31
TEORÍA DE LA SOLUBILIZACIÓN	32
MICROEMULSIONES – CLASIFICACIÓN:	32
DISEÑO DE MICROEMULSIONES DE APLICACIÓN FARMACÉUTICA - SELECCIÓN DE LOS COMPONENTES	34
SURFACTANTES/EMULGENTES	34
ESTABILIZACIÓN ELECTROSTÁTICA	36
ESTABILIZACIÓN ESTÉRICA	36
COTENSIOACTIVOS	37
FASE APOLAR	38
FASE ACUOSA	38
OTROS FACTORES A TENER EN CUENTA AL MOMENTO DE PREPARAR LA MICROEMULSIÓN	38
PARÁMETRO DE EMPAQUETAMIENTO: P_c	40
PREPARACIÓN DE LAS MICROEMULSIONES	41
CARACTERIZACIÓN FISCOQUÍMICA DE LAS MICROEMULSIONES	42
MICROEMULSIONES COMO VEHÍCULOS PORTADORES DE FÁRMACOS - GENERALIDADES	48
LIBERACIÓN SOSTENIDA DE FÁRMACOS: DINÁMICA DEL EQUILIBRIO MICELAR APLICADO A	
SURFACTANTES NO IÓNICOS POLIOXIETILÉNICOS	49
VENTAJAS ASOCIADAS A LAS MICROEMULSIONES	53
DESVENTAJAS ASOCIADAS AL EMPLEO DE LAS MICROEMULSIONES	53
OBJETIVOS	55
OBJETIVO GENERAL	55
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	55
MATERIALES Y MÉTODOS	56
MATERIALES	56
MÉTODOS	56
CONSTRUCCIÓN DEL DIAGRAMA DE FASES	56

PREPARACIÓN DE LAS FORMULACIONES	56
ANÁLISIS DEL TAMAÑO DE LA FASE INTERNA.....	57
pH.....	57
ESTABILIDAD TERMODINÁMICA DE LAS MUESTRAS SELECCIONADAS	57
TEST DE CENTRIFUGACIÓN.....	57
MEDICIÓN DE CONDUCTIVIDAD	57
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	58
CONSTRUCCIÓN DE DIAGRAMAS DE FASE PSEUDOTERNARIO.....	61
ESTUDIOS DE ESTABILIDAD.....	61
MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN	63
CONDUCTIVIDAD.....	63
MEDICIÓN DE pH.....	65
MEDICIÓN DE VISCOSIDAD	65
CONCLUSIÓN.....	66
BIBLIOGRAFÍA.....	67
CAPÍTULO II: MICROEMULSIONES COMO VEHÍCULOS PORTADORES DE FÁRMACOS OCULARES.....	74
INTRODUCCIÓN.....	75
ESTRUCTURA DEL OJO: GENERALIDADES.....	75
VÍAS DE ADMINISTRACIÓN OCULAR.....	77
GLAUCOMA	85
DESVENTAJAS DE LA ADMINISTRACIÓN TÓPICA EN PACIENTES CON GLAUCOMA	86
TRATAMIENTO DE LA ENFERMEDAD DE GLAUCOMA	86
DISEÑO DE FORMULACIÓN TÓPICA DE ACETAZOLAMIDA.....	89
COEFICIENTE DE PERMEACIÓN:	90
pKa:	90
OBJETIVOS.....	94
OBJETIVO GENERAL.....	94
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	94
MATERIALES Y MÉTODOS.....	95
MATERIALES.....	95
ANIMALES	95
MÉTODOS.....	96
VISCOSIDAD.....	96
DENSIDAD	96
TENSIÓN SUPERFICIAL.....	96
pH.....	96
OSMOLARIDAD	96
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	97
SELECCIÓN DE COMPONENTES.....	97
CARACTERIZACIÓN FISCOQUÍMICA - FÓRMULA FINAL DE CITRONELLA Y PRECURSORES	99
MEDICIÓN DE TAMAÑO PARTICULAR, VISCOSIDAD, DENSIDAD, pH, OSMOLARIDAD	99
MICROSCOPIA ELECTRÓNICA	102
EVALUACIÓN DE CAPACIDAD DE CARGA DEL SISTEMA: HPLC.....	102
HPLC: COMPOSICIÓN (% p/p) DE LOS VEHÍCULOS ENSAYADOS.....	103
HPLC: RESULTADOS OBTENIDOS.....	104
RESULTADOS - ENSAYOS <i>IN-VIVO</i>	105
PRUEBAS DE IRRITACIÓN OCULAR: TEST DRAIZE	105
MEDICIÓN DE PIO	110
PRINCIPIOS DE MEDICIÓN DE PIO.....	110
CONCLUSIÓN.....	116
BIBLIOGRAFÍA.....	117
CAPÍTULO III: MICROEMULSIONES – EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD DE AUTOCONSERVACIÓN.....	124
INTRODUCCIÓN.....	125
BACTERIAS.....	126
ESTRUCTURA DE LA CÉLULA BACTERIANA.....	126
CLASIFICACIÓN DE LAS BACTERIAS SEGÚN SU FORMA	126
CLASIFICACIÓN DE BACTERIAS SEGÚN TÉCNICAS DE TINCIÓN DIFERENCIAL.....	127

ALGUNAS CARACTERÍSTICAS COMPARATIVAS DE BACTERIAS G(+), G(-) Y AAR(+) (MICOBACTERIAS)	
.....	128
BACTERIAS GRAM POSITIVAS	128
BACTERIAS GRAM NEGATIVAS.....	129
BACTERIAS ÁCIDO-ALCOHOL RESISTENTES.....	131
HONGOS FILAMENTOSOS Y LEVADURAS	132
EMPLEO DE CONSERVANTES EN FORMAS FARMACÉUTICAS	133
NANO/MICROEMULSIONES - EFECTO ANTIMICROBIANO.....	134
TESTS DE EFICACIA CONSERVADORA DE AGENTES CONSERVANTES	136
OBJETIVOS.....	140
OBJETIVO GENERAL.....	140
OBJETIVO ESPECÍFICO.....	140
MATERIALES Y MÉTODOS.....	141
ENSAYOS PRELIMINARES DE EXPOSICIÓN – METODOLOGÍA APLICADA: BASADA EN MÉTODOS OFICIALES	141
PROCEDIMIENTO PARA DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD CONSERVANTE DE LA FÓRMULA	141
CEPAS ENSAYADAS EN EL LABORATORIO	141
PREPARACIÓN DEL INÓCULO MICROBIOLÓGICO INICIAL	142
MEDICIÓN DE LUZ TRANSMITIDA	142
ESCALA DE MC FARLAND	142
RECUPERACIÓN DE BACTERIAS	143
MEDIOS DE CULTIVO EMPLEADOS.....	143
DILUCIÓN DE LAS SUSPENSIONES CELULARES PREVIO A LA SIEMBRA EN PLACA.....	143
TÉCNICAS DE SIEMBRA EMPLEADAS	144
EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA	146
RECUENTO DE CÉLULAS VIABLES/RECUENTO DE COLONIAS	146
INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS EXPRESADOS EN UNIDADES LOGARÍTMICAS.....	147
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	148
PROCESAMIENTO DE DATOS.....	149
ENSAYOS MICROBIOLÓGICOS PARA EVALUACIÓN DE LA EFICACIA CONSERVANTE DE LA MICROEMULSIÓN DE CITRONELLA.....	150
CONCLUSIÓN.....	153
BIBLIOGRAFÍA.....	154
CAPÍTULO IV: APLICACIÓN DE MICROEMULSIONES EN EL CONTROL DE INSECTOS PLAGA.....	159
INTRODUCCIÓN	160
ARTRÓPODOS: GENERALIDADES	160
IMPORTANCIA SANITARIA DE LA FAMILIA CULICIDAE (MOSQUITOS):	160
BIOLOGÍA GENERAL: <i>CULEX PIPIENS.PIPIENS</i>	162
FASE ACUÁTICA	163
HUEVOS	163
LARVA	164
PUPAS	166
FASE AÉREA	167
IMPORTANCIA DE <i>C.P.PIPIENS</i> EN LA SALUD POBLACIONAL	167
FORMULACIÓN DE ACEITES ESENCIALES	172
OBJETIVOS.....	174
OBJETIVO GENERAL.....	174
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	174
MATERIALES Y MÉTODOS.....	175
MATERIALES	175
INSECTOS.....	175
MÉTODOS.....	175
DYNAMIC LIGHT SCATTERING (DLS)	175
MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN	175
ACTIVIDAD LARVICIDA AGUDA.....	176
ACTIVIDAD LARVICIDA RESIDUAL	176
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	178

CARACTERIZACIÓN DE MICROEMULSIONES	178
ACTIVIDAD INSECTICIDA	181
CONCLUSIÓN.....	188
BIBLIOGRAFÍA.....	190

DISEÑO Y DESARROLLO DE
MICROEMULSIONES CON
APLICACIONES BIOMÉDICAS

INTRODUCCIÓN GENERAL

La nanotecnología es la técnica que reduce el tamaño de los materiales a nivel atómico (*Farokhzad y Langer, 2009*). Emplea un amplio rango de disciplinas científicas con el fin de crear y estudiar estructuras moleculares que tienen una dimensión espacial que va desde 1 a 100 nm, siendo 1 nm la millonésima parte de 1 mm (*Natarajan et al, 2014*).

Las propiedades físicas, químicas y biológicas desarrolladas por un material a escala nanométrica a menudo difieren significativamente de aquellas exhibidas por el mismo material a mayor escala.

Las nanoestructuras presentan dimensiones que coinciden con los tamaños típicos de las unidades funcionales presentes en organismos vivos, viéndose facilitada la interacción con biomoléculas, células, compartimientos celulares, organelas, etc (*Nel et al, 2009*). Consecuentemente, una de las aplicaciones emergentes de la nanotecnología es la "nanomedicina". Este término, se emplea cuando se hace uso de la nanotecnología para la resolución de problemas médicos (*Natarajan et al, 2014*).

Desde el punto de vista farmacéutico, la nanomedicina propone el desarrollo de sistemas portadores de fármacos capaces de:

- a)** identificar el sitio blanco (órgano, célula, núcleo, citoplasma, organela) dirigirse a él y entregar selectivamente la dosis terapéutica.
- b)** promover la liberación controlada del fármaco pudiendo transportar en simultáneo varios principios activos y/o biomacromoléculas (péptidos, proteínas y ácidos nucleicos) (*Crommelin, Park y Florence, 2010*).

En términos de liberación controlada de principios activos, los objetivos primordiales de la nanomedicina son: maximizar la biodisponibilidad y eficacia, controlar parámetros tales como toxicidad no específica y promover la reversión de propiedades fisicoquímicas desfavorables, logrando perfiles biofarmacológicos deseables al posibilitar la superación de eventuales limitaciones que pudieran presentar los fármacos (incapacidad para atravesar barreras biológicas, baja solubilidad, susceptibilidad a degradación) (*Sanna, Pala y Sechi, 2014*).

Cabe destacar que, a pesar de la necesidad del empleo de la nanotecnología para optimizar el tratamiento de determinadas afecciones, la obtención de productos de liberación controlada se ve limitada (*Natarajan et al, 2014*).

El Glaucoma constituye un buen ejemplo de enfermedad que requeriría el desarrollo de este tipo de fórmulas. Dicha patología, consiste en una neuropatía óptica progresiva que genera pérdida irreversible de la visión afectando a más de 60 millones de personas en todo el mundo (*Quigley y Broman, 2006; Pita-Thomas y Goldberg, 2013*). Constituye, además, la segunda causa de ceguera a nivel mundial y ocupa junto a otras enfermedades (retinopatía diabética, cataratas) un lugar importante para entidades relacionadas con problemas de salud pública (*Buys et al, 2008*).

La presión intraocular (PIO) elevada es el principal factor de riesgo, desencadenante de la enfermedad, que puede ser controlado (*Leske y Podgor, 1983; Tsai, Robin y Smith, 2019*). Consecuentemente, el objetivo del tratamiento terapéutico para glaucoma, es preservar la función visual proporcionando un descenso mantenido y estable de la PIO, mediante terapias que presenten un perfil de seguridad favorable y faciliten la adherencia del paciente al tratamiento (*Gooch et al, 2012*).

Ninguna opción disponible hoy en día, reúne todas las características anteriormente mencionadas. Generalmente, para el tratamiento de Glaucoma se adopta la vía de administración tópica a través del uso de gotas oftálmicas. No obstante, para estas formas farmacéuticas convencionales, la biodisponibilidad del fármaco se corresponde al 5% (en el mejor de los casos) y la duración del efecto terapéutico se ve, por lo general, limitada (*Gaudana et al, 2009; Gooch et al, 2012*).

El tratamiento farmacológico presenta además problemas relacionados al cumplimiento del régimen terapéutico (factor crucial para detener el avance de la enfermedad). Las razones asociadas a la falta de adherencia al tratamiento son multifactoriales e incluyen falta de conocimiento y dificultad en la administración, ausencia de respuesta en algunos pacientes, existencia de efectos secundarios locales y sistémicos, etc.

Sumado a esto, algunos tratamientos disminuyen su eficacia hipotensora con el paso del tiempo y además, el uso prolongado de formulaciones que contengan conservantes suele ocasionar daños en la superficie ocular (*Doblhammer, 2018; Olthoff et al, 2005*).

Conociendo la gravedad de la enfermedad de Glaucoma (evolución a ceguera) y teniendo en cuenta que, como consecuencia de la escasa efectividad de las formulas tópicas tradicionalmente empleadas, el avance resulta prácticamente inevitable se decidió abordar esta problemática a través del desarrollo de un producto capaz de controlar la liberación de fármacos antiglaucomatosos y mejorar la biodisponibilidad, evitando los inconvenientes asociados a las formulaciones de uso común.

Los colirios basados en sistemas coloidales del tipo micro/nano emulsiones aceite en agua, ofrecen excelentes propiedades farmacéuticas y biofarmacéuticas, resultando ventajosos particularmente en lo referente a su disminuida viscosidad, alta capacidad portadora de principios activos, biocompatibilidad y simplicidad de obtención. Asimismo, estas fórmulas, han demostrado liberación sostenida de fármacos en córnea y aumento de la permeabilidad pudiendo acceder a sitios profundos de la estructura ocular y prolongar la duración del efecto farmacológico (*Tekade y Tekade, 2016*).

Durante la Tesis Doctoral se han diseñado microemulsiones como vehículos portadores de fármacos antiglaucomatosos: Acetazolamida - Timolol, siendo el objetivo principal la obtención de sistemas capaces de favorecer un avance fármaco-terapéutico en lo que a tratamiento tópico de Glaucoma se refiere.

De los sistemas diseñados, fue la microemulsión de citronella la que demostró gran potencial para vehiculizar los fármacos anteriormente mencionados.

Referido a los componentes de este sistema, cabe destacar que, el efecto bactericida y antimicótico reportado para las esencias de origen natural (*Burt, 2004; Pandey y Rai, 2003 ; Perricone et al, 2015*) sumado a las potenciales *propiedades conservantes* (*Kadri et al, 2017*) atribuibles a las microemulsiones, dio lugar al desarrollo de estudios basados en la evaluación del efecto inhibitorio de la fórmula sobre el crecimiento de bacterias y hongos. De este modo, se pretendió verificar la factibilidad de autoconservación del sistema diseñado, a los fines de evitar la incorporación de agentes conservantes y sus consecuentes efectos indeseables. Dentro de éstos últimos, se incluyen ciertos síntomas oculares (ardor, sensaciones de presencia de cuerpo extraño y punzantes, lagrimeo y picazón de párpados) y determinados signos clínicos (queratitis punteada superficial, hiperemia conjuntival, blefaritis, aumento de la osmolaridad, reducción de la producción de lágrimas, disfunción del film lagrimal e hiperemia ocular) conocidos

como mecanismos fisiopatológicos emergentes del rol que cumplen los conservantes en las gotas oftálmicas de uso convencional (*Walsh y Jones, 2019*).

Por otro lado, atendiendo a las necesidades económicas, de sanidad y medio ambiente asociadas al sector productivo, tenemos que las formulaciones insecticidas comúnmente empleadas consisten en sistemas dispersos del tipo sólido-líquido (suspensiones), líquido-líquido (emulsiones) y mezclas de estos (suspo-emulsiones).

Durante las últimas décadas estas fórmulas, fueron mayoritariamente preparadas por procedimientos de simple prueba y error lo que se traduce en una falta de predicción de la estabilidad física del producto a largo plazo (*Tadros, 2005*).

La nanotecnología posibilitaría el diseño de formulaciones que, además de mejorar la actividad del insecticida incorporado, serían capaces de mantenerse estables en el tiempo representando esto un avance respecto de los productos tradicionalmente empleados (*Tadros, 2005*).

El potencial aumento de la efectividad evidenciado en dispersiones nanométricas, permitió evaluar la posibilidad de diseñar nuevos productos insecticidas basados en compuestos fitoquímicos (aceites esenciales y sus componentes individuales).

La nanoformulación de estos compuestos, posibilitaría con dosis significativamente menores alcanzar un efecto insecticida que igualaría o superaría en actividad a la del compuesto sin formular e incluso mejoraría el efecto de la misma fórmula a mayor escala. De este modo, se podría evitar el empleo de grandes dosis de insecticida lo que se traduciría en beneficios económicos (*Tadros, 2005*). Sumado a ello, la utilización de compuestos fitoquímicos así como las propiedades de biocompatibilidad y biodegradabilidad de los adyuvantes presentes en las fórmulas diseñadas, ofrecería grandes ventajas a nivel sanitario y medioambiente.

BIBLIOGRAFÍA

Burt, S. (2004). Essential oils: Their antibacterial properties and potential applications in foods—A review. *International Journal of Food Microbiology*, 94(3), pp: 223-253.

Buys, Y., Goldberg, I., Lambrow, G. N y Ritch, R. (2008). World glaucoma day, 6 March 2008: tackling glaucoma internationally. *Eye*, 9(6), pp: 01-02.

Crommelin, D., Park, K y Florence, A. T. (2010). Pharmaceutical nanotechnology: Unmet needs in drug delivery. *Journal of Controlled Release*, 141(3), pp: 263-264.

Doblhammer, G. (2018). Pharmacoepidemiological assessment of adherence and influencing cofactors among primary open-angle glaucoma patients — An observational cohort study. *PLoS ONE*, 13(1), pp: 01-14.

Farokhzad, O. C y Langer, R. (2009). Impact of Nanotechnology on Drug Delivery. *American Chemical Society Nano*, 3(1), pp: 16-20.

Gaudana, R., Jwala, J., Boddu, S. H y Mitra, A. K. (2009). Recent perspectives in ocular drug delivery. *Pharmaceutical Research*, 26(5), pp: 1197-1216.

Gooch, N., Molokhia, S. A., Condie, R., Burr, R. M., Archer, B., Ambati, B. K y Wirostko, B. (2012). Ocular drug delivery for glaucoma management. *Pharmaceutics*, 4(1), pp: 197-211.

Kadri, H., Devanthia, P. V., Overtona, T y Gkatzionis, K. (2017). Do oil-in-water (O/W) nano-emulsions have an effect on survival and growth of bacteria?. *Food Research International*, 101, pp: 114-128.

Leske M. C y Podgor, M. J. Intraocular pressure, cardiovascular risk variables, and visual field defects (1983). *American Journal Of Epidemiology*, 118(2), pp: 280-287.

Natarajan, J. V., Darwitan, A., Barathi, V. A., Ang, M., Htoon, H. M., Boey, F., Tam, K. C., Wong, T. T y Venkatraman, S. S. (2014). Sustained Drug Release in Nanomedicine: A Long-Acting Nanocarrier-Based Formulation for Glaucoma. *American Chemical Society Nano*, 8(1), pp: 419-429.

Nel, A. E., Mädler, L., Velegol D., Xia, T., Hoek, E. M. V., Somasundaran, P., Klaessig, F., Castranova, V y Thompson, M. (2009). Understanding biophysicochemical interactions at the nano–bio interface. *Nature Materials*, 8(7), pp: 543-557.

Olthoff, C. M., Schouten, J. S., Van de Borne, B. W y Webers, C. A. (2005). Noncompliance with Ocular Hypotensive Treatment in Patients with Glaucoma or Ocular Hypertension An Evidence-Based Review. *Ophthalmology*, 112(6), pp: 953-961.

Pandey, A. K y Rai, M. (2003). Antimycotic Potential in some naturally occurring Essential Oils. En: Rai, M. K y Mares, D (eds). *Plant derived antimycotics: Current Trends and Future Prospects*, pp: 343-356. The Haworth Press, USA.

Perricone, M., Arace, E., Corbo, M. R., Sinigaglia, M y Bevilacqua, A. (2015). Bioactivity of

essential oils: A review on their interaction with food components. *Frontiers in Microbiology*, 6(76), pp: 1-7.

Pita-Thomas, D. W y Goldberg, J. L. (2013). Nanotechnology and glaucoma: little particles for a big disease. *Current Opinion in Ophthalmology*, 24(2), pp: 130-135.

Quigley, H y Broman, A. T. (2006). The number of people with glaucoma worldwide in 2010 and 2020. *British Journal of Ophthalmology*, 90(3), pp: 262-267.

Sanna, V., Pala, N y Sechi, M (2014). Targeted therapy using nanotechnology: focus on cancer. *International Journal of Nanomedicine*, 9(1), pp: 467-483.

Tadros, T. F (ed). Application of surfactants in agrochemicals. (2005). En: *Applied Surfactants: Principles and Applications*, pp: 503-592. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, UK.

Tekade, R. K y Tekade, M. (2016). Ocular Bioadhesives and their applications in Ophthalmic Drug Delivery. En Pathak, Y., Sutariya, V e Hiramani, A. A (eds). *Nano - Biomaterials for ophthalmics drug delivery*, pp: 211-230. Springer International Publishing, Suiza.

Tsai, T., Robin, A y Smith, J. P. (2007). An evaluation of how glaucoma patients use topical medications: a pilot study. *Transactions of the American Ophthalmological Society*, 105, pp: 29-33.

Walsh, K y Jones, L. (2019). The use of preservatives in dry eye drops. *Clinical Ophthalmology*, 13, pp: 1409-1425.

CAPÍTULO I: DISEÑO DE MICROEMULSIONES

INTRODUCCIÓN

GENERALIDADES

Las microemulsiones son dispersiones de dos líquidos inmiscibles formadas con moléculas surfactantes. En general, uno de los líquidos es agua (eventualmente puede contener sales). El otro líquido presenta carácter apolar y es comúnmente denominado aceite, aún cuando química y estructuralmente no lo sea (*Lima et al, 2018*).

Al igual que las emulsiones, las microemulsiones frecuentemente contienen gotas de uno de los componentes (agua-aceite) rodeadas por una capa de anfifilo y dispersas en el otro. Así, se obtienen microemulsiones o/w (nanogotas de aceite dispersas en agua) o microemulsiones w/o (nanogotas de agua dispersas en aceite) (*Lawrence y Rees, 2000*).

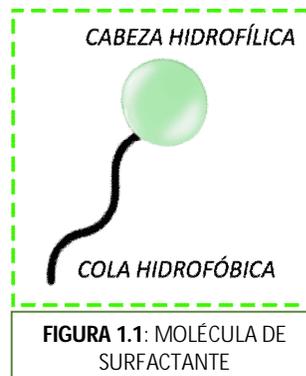
Las microemulsiones se muestran como una simple solución líquida, ópticamente isotrópica y termodinámicamente estable. Presentan interés científico para el farmacéutico, debido a la capacidad de incorporar una amplia variedad de moléculas activas de alto impacto sanitario, logrando mejoras en la biodisponibilidad y especificidad. Además, poseen otras cualidades ventajosas tales como la facilidad de preparación, reducida viscosidad y gran estabilidad (*Juškaitė, Ramanauskienė y Briedis, 2015; Lawrence y Rees, 2000; Tekade y Tekade, 2016*).

En este apartado, se da una perspectiva sobre la formación, clasificación, reconocimiento, aplicación y potenciales ventajas y desventajas de las microemulsiones y sistemas afines como formulaciones portadoras de fármacos.

SURFACTANTES

Para comprender la formación de las microemulsiones, resulta necesario conocer un poco más acerca de las moléculas anfifílicas (surfactantes).

Los surfactantes están compuestos por una porción escasamente soluble en agua (cola hidrofóbica) que generalmente consiste en una cadena lineal o ramificada de hidrocarburos y por un grupo polar excesivamente soluble en ella (cabeza hidrofílica) que puede ser no iónico, iónico o zwitteriónico, acompañado de contraiones en los últimos dos casos, véase Figura 1.1.



Las moléculas de surfactantes se conocen como anfifilos (del griego *amphi*, en ambas partes; *philo*: amistoso). También se las denomina tensioactivos, pues en solución acuosa muestran cierta tendencia a segregarse hacia la superficie del líquido (con las porciones alifáticas dirigidas hacia afuera del agua) siendo capaces de abatir notablemente la tensión superficial bajo estas circunstancias (Tadros, 2014).

ACTIVIDAD SUPERFICIAL DE LOS SURFACTANTES

Debido a la naturaleza anfifílica, las moléculas de surfactante experimentan condiciones subóptimas al disolverse en solución acuosa. Si la cadena hidrocarbonada es larga, el surfactante no se solubiliza en agua. Sin embargo, para moléculas de menor tamaño, el anfifilo es soluble en dicho solvente.

No obstante, la interacción entre la porción hidrófoba-agua resulta energéticamente menos favorable que la interacción porción hidrófila-agua. De este modo, la reducción del contacto entre la cadena lipófila-agua, se presenta como una alternativa del sistema para reducir su energía libre.

Consecuentemente, al disolver una pequeña cantidad de anfifilo en agua, este se deposita en la superficie, formando una capa que se interpone entre el aire y el líquido (Malmsten, 2002), véase Figura 1.2.

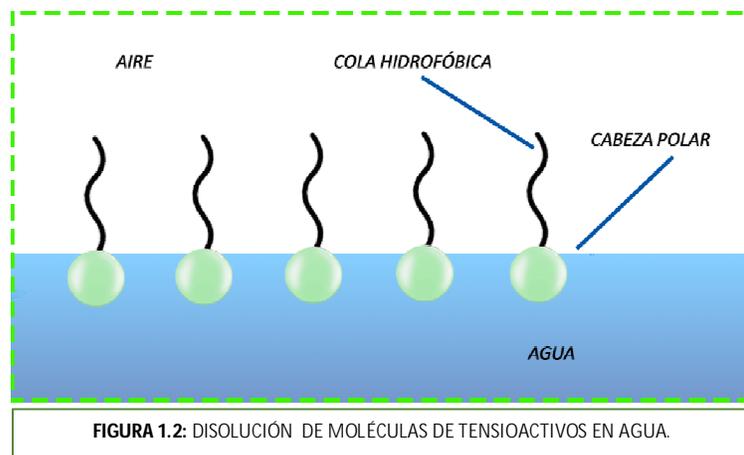


FIGURA 1.2: DISOLUCIÓN DE MOLÉCULAS DE TENSIOSACTIVOS EN AGUA.

La Figura 1.3 que se presenta a continuación, indica la variación de la tensión superficial en función de la concentración de surfactante.

A partir del valor de tensión superficial que corresponde al agua pura (72 mN/m), se observa una disminución con el aumento de la concentración de surfactante. Por lo general, los tensioactivos efectivos reducen la tensión superficial entre el agua y el aire de 72 a 35 mN /m (Soberón-Chávez y Raina, 2011).

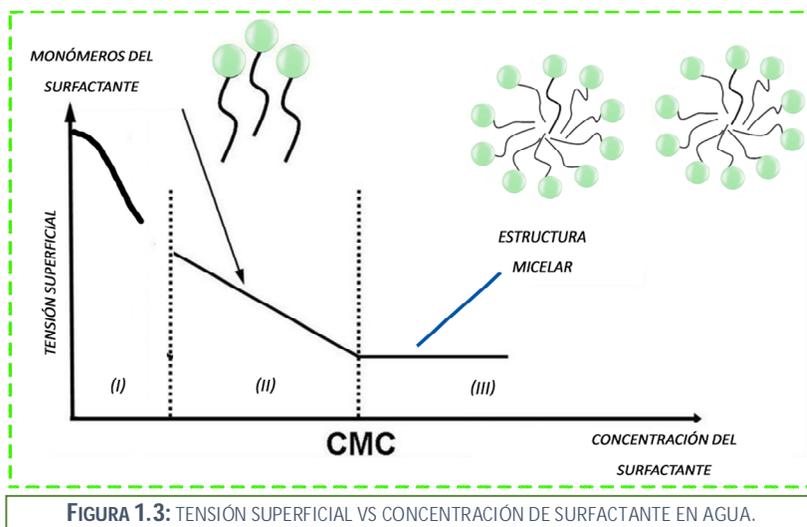


FIGURA 1.3: TENSIÓN SUPERFICIAL VS CONCENTRACIÓN DE SURFACTANTE EN AGUA.

En la primera zona (I), la gran mayoría de las moléculas de surfactante se adsorben a la superficie agua-aire y la concentración superficial crece rápidamente. A partir de cierto valor, la superficie está ocupada por una capa monomolecular de surfactante y la tensión interfacial decrece linealmente con el logaritmo de la concentración de surfactante en agua. En esta segunda zona (II) la adición de una mayor cantidad de

anfifilo, da lugar a un incremento en la concentración superficial, hasta llegar a un valor límite (cuando ya no es posible localizar más moléculas de tensioactivo en la superficie). Es decir, a medida que se agregan monómeros tensioactivos a la solución, la tensión interfacial disminuirá hasta que la concentración de surfactante alcance un intervalo de concentración conocido como la concentración micelar crítica (CMC) (*Soberón-Chávez y Raina, 2011*). A partir de ese momento, las moléculas de surfactante añadidas deben solubilizarse en la fase acuosa, lo que resulta poco favorable desde el punto de vista energético, debido a la presencia de las porciones hidrófobas de los tensioactivos (*Malmsten, 2002*). Consecuentemente, luego de haberse alcanzado la CMC (que se corresponde a la transición entre las zonas II y III) las interacciones hidrofóbicas entre las moléculas de surfactante se tornan suficientemente importantes respecto de las interacciones hidrófilas surfactante/agua, como para formar espontáneamente agregados conocidos como MICELAS (*Soberón-Chávez y Raina, 2011*).

Finalmente, se observa el cambio a la tercera zona (III) en donde la tensión superficial permanece constante dado que solo la forma monomérica contribuye a la reducción de dicha tensión (*Rosen, 2004*).

MICELAS

Pueden considerarse dos tipos de micelas:

- **micelas normales o directas** en donde las cadenas hidrocarbonadas se disponen hacia el interior y los grupos que constituyen las cabezas polares hidrófilas quedan en contacto con el medio acuoso (fase externa), véase Figura 1.4.
- **micelas invertidas**: este tipo de estructuras se forma en medios no polares. En ella, el interior se encuentra constituido por las cabezas polares quedando las porciones hidrofóbicas en contacto con el medio no polar (aceite) (*Tadros, 2014*), véase Figura 1.5.

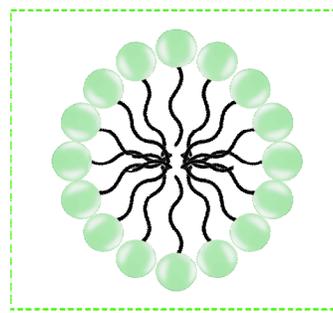


FIGURA 1.4: MICELA DIRECTA

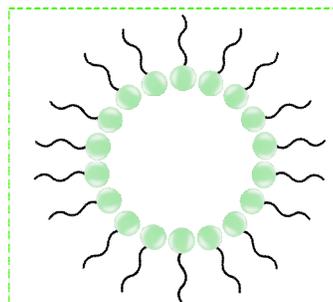


FIGURA 1.5: MICELA INVERTIDA

Una propiedad interesante de ambos tipos de micelas, es la habilidad para solubilizar especies químicas, que de por sí no son solubles en el solvente puro. De este modo, es posible incorporar aceites y grasas en solventes acuosos, alojándose estos materiales en el interior de las micelas directas. De igual forma, compuestos polares pueden solubilizarse en aceite mediante el empleo de micelas invertidas (*Zana, 2005*).

OTROS SISTEMAS FORMADOS POR LOS SURFACTANTES

Tras la incorporación de surfactantes a mezclas inmiscibles de aceite y agua, las moléculas de anfifilo pueden localizarse en la interfase (resultando esto favorable desde el punto de vista termodinámico) dando lugar a la aparición de un gran número de fases observables a nivel micro y macroscópico. Un ejemplo de un posible arreglo a nivel macroscópico es la microemulsión ópticamente isotrópica.

Una gran variedad de las estructuras asociadas que los surfactantes pueden formar, en presencia de aceite y agua, presentan potencial uso a nivel farmacéutico (*Lawrence y Rees, 2000*).

Algunos de los sistemas coloidales ampliamente examinados como portadores de fármacos son: las micelas, las emulsiones (también conocidas como macroemulsiones), las nanoemulsiones y las microemulsiones (*Simonazzi et al, 2018*).

Durante la Tesis Doctoral se ha trabajado particularmente en el diseño de microemulsiones como vehículo para la administración de principios activos. En esta sección, haremos hincapié en la descripción de este sistema, estableciendo comparaciones con macroemulsiones (emulsiones) y otras formulaciones coloidales (nanoemulsiones y micelas), a los fines de comprender el motivo de la elección de las microemulsiones como sistemas portadores de fármacos.

MICELAS

Las micelas normales, son ópticamente isotrópicas y termodinámicamente estables, consisten en dispersiones acuosas de surfactantes. No toleran elevadas concentraciones de solvente apolar (como los alcanos) debido a su limitada capacidad para solubilizar aceites, ni permiten incorporar grandes cantidades de compuestos lipófilos debido al reducido entorno hidrofóbico que forman (*Bagwe et al, 2001; Lu y Park, 2013*), véase Figura 1.6.

EMULSIONES

Las emulsiones son coloides metaestables, ópticamente turbias, con tamaño de gota entre 0,5 - 5 μm . Debido a este gran tamaño particular, al cabo de un tiempo ocurre separación de fases (agua-aceite). No se forman espontáneamente, presentan inestabilidad termodinámica.

Como consecuencia de la gran cantidad de aceite solubilizado (1-30%) en una emulsión o/w, una elevada concentración de fármaco hidrófobo puede dispersarse en la fase acuosa (*Bagwe et al, 2001; Lu y Gao, 2010*), véase Figura 1.6.

NANOEMULSIONES

Se las conoce también como emulsiones submicrométricas. Están compuestas por dos fases inmiscibles (aceite-agua) y surfactantes. Una de las fases se dispersa en la otra formando gotas de tamaño reducido (<100 nm). Estos sistemas, deben distinguirse de las microemulsiones por ser termodinámicamente inestables (*Mc Clements, 2012*).

MICROEMULSIONES

Bajo determinadas condiciones, las gotas de aceite de una emulsión pueden volverse lo suficientemente pequeñas y no refractar la radiación, formándose entonces una dispersión transparente. Esta dispersión se conoce como microemulsión.

Las microemulsiones son transparentes debido al reducido tamaño de sus gotas (<100 nm). Asimismo, se trata de sistemas termodinámicamente estables que se forman espontáneamente a ciertas concentraciones de aceite, agua y surfactantes

(Ruckenstein, 1993). Comparten propiedades con las emulsiones, ya que presentan alta capacidad portadora de fármacos y se asemejan a las micelas dado que se forman espontáneamente y son termodinámicamente estables, no exhibiendo problemas de separación de fases (Narang, Delmarre y Gao, 2007).

Sin embargo, a diferencia de los sistemas micelares y como ventaja respecto de éstos, las microemulsiones poseen mayor capacidad portadora de fármacos y no se rompen fácilmente tras la dilución, lo que evita la liberación repentina del fármaco y/o su precipitación. Es decir, la estabilidad de la micela a diferencia de la microemulsión, se ve comprometida cuando por efecto de la dilución se alcanzan concentraciones inferiores a la CMC (Lu et al, 2018; Manoharan et al, 2010), véase Figura 1.6.

MICROEMULSIONES, MACROEMULSIONES Y SISTEMAS MICELARES: CARACTERÍSTICAS

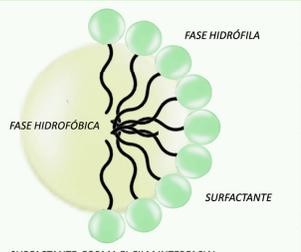
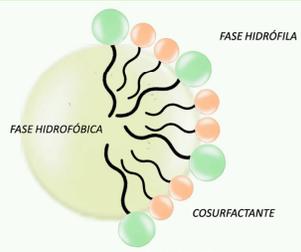
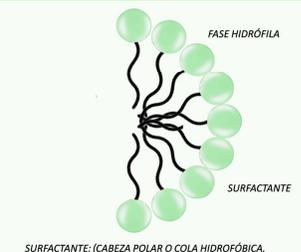
MACRO-EMULSIÓN O EMULSIÓN CONVENCIONAL	MICROEMULSIÓN	MICELAS
 <p>ASPECTO LECHOSO Y OPACO TAMAÑO PARTICULAR: > 500 nm FORMACIÓN: AGITACIÓN Y/O CALOR ESTABILIDAD TERMODINÁMICA: INESTABLE</p>	 <p>ASPECTO TRANSPARENTE O TRASLÚCIDO TAMAÑO PARTICULAR: 20 - 200 nm FORMACIÓN: ESPONTÁNEA ESTABILIDAD TERMODINÁMICA: ESTABLE PRESENTA COSURFACTANTE EN UNA RELACIÓN ESPECÍFICA CON EL SURFACTANTE.</p>	 <p>ASPECTO TRANSPARENTE TAMAÑO PARTICULAR: 10 - 80 nm FORMACIÓN: ESPONTÁNEA ESTABILIDAD TERMODINÁMICA: ESTABLE</p>
 <p>FASE HIDRÓFILA FASE HIDRÓFÓLICA SURFACTANTE SURFACTANTE: FORMA EL FILM INTERFACIAL</p>	 <p>FASE HIDRÓFILA FASE HIDRÓFÓLICA SURFACTANTE COSURFACTANTE</p>	 <p>FASE HIDRÓFILA SURFACTANTE SURFACTANTE: (CABEZA POLAR O COLA HIDRÓFÓLICA, FORMAN EL INTERIOR DE LA MICELA.</p>
CONCENTRACIÓN DE SURFACTANTE BAJA < 5 %	CONCENTRACIÓN DE SURFACTANTE ALTA: 10 - 80% CONCENTRACIÓN DE COSURFACTANTE > 5%	CONCENTRACIÓN DE SURFACTANTE BAJA
<p>VENTAJAS: DISMINUIDA CANTIDAD DE SURFACTANTE ALTA CAPACIDAD PARA SOLUBILIZAR EL FÁRMACO</p>	<p>VENTAJAS: BAJA VISCOSIDAD ALTA CAPACIDAD PARA SOLUBILIZAR EL FÁRMACO TAMAÑO DE GOTA REDUCIDO FÁCIL PREPARACIÓN VIDA MEDIA: LARGA</p>	<p>VENTAJAS: BAJA VISCOSIDAD TAMAÑO DE GOTA REDUCIDO FÁCIL PREPARACIÓN VIDA MEDIA: LARGA</p>
<p>DESVENTAJAS ALTA VISCOSIDAD INESTABILIDAD VIDA MEDIA: CORTA GOTAS DE GRAN TAMAÑO</p>	<p>DESVENTAJAS ALTA CONCENTRACIÓN DE SURFACTANTES TOXICIDAD POTENCIAL DEL SURFACTANTE</p>	<p>DESVENTAJAS BAJA CAPACIDAD PARA SOLUBILIZAR EL FÁRMACO TOXICIDAD POTENCIAL DEL SURFACTANTE</p>

FIGURA 1.6: EMULSIONES, MICROEMULSIONES Y MICELAS - CARACTERÍSTICAS COMPARATIVAS (Huang, Dong y Karki, 2018; Lu y Gao, 2010; Wang y Zang, 2013).

TERMINOLOGÍA Y DEFINICIÓN DE LAS MICROEMULSIONES

Hoar y Schulman reportaron en 1943 la definición de microemulsión asociando este término a sistemas transparentes, que se obtenían tras la titulación de una emulsión aceite en agua con un alcohol de cadena media (hexanol). A partir de este hallazgo, dicha terminología comenzó a emplearse para sistemas que contuvieran: una fase no polar, una fase acuosa, un surfactante y un cosurfactante.

Si bien el cosurfactante suele estar presente en la mayoría de las microemulsiones, estos sistemas pueden también obtenerse empleando solo surfactantes.

Resulta importante señalar que el término microemulsión era (y en ocasiones es) utilizado en la literatura para describir varios sistemas cristalinos líquidos (laminares, hexagonales y cúbicos), sistemas de surfactantes (micelas directas y micelas inversas) y emulsiones micronizadas utilizando energía externa (emulsiones submicrométricas).

Con el objeto de evitar esta confusión, Danielsson y Lindmann propusieron la siguiente definición: "*solución líquida termodinámicamente estable, basada en un sistema de agua, aceite y anfífilo, ópticamente isotrópico.*" Dado este concepto quedarían excluidos de la definición los siguientes sistemas:

- Las soluciones acuosas de tensioactivos (micelas y sistemas no micelares)
- Fases cristalinas líquidas (mesofases)
- Emulsiones, incluyendo emulsiones micronizadas
- Los sistemas libres de surfactante (*Alany y Wen, 2008*).

PRINCIPIOS BÁSICOS DE LA FORMACIÓN DE MICROEMULSIONES

TEORÍA TERMODINÁMICA

Las microemulsiones, a diferencia de las emulsiones, se forman espontáneamente, son sistemas termodinámicamente estables lo que implica que tienen $\Delta G (\leq 0)$.

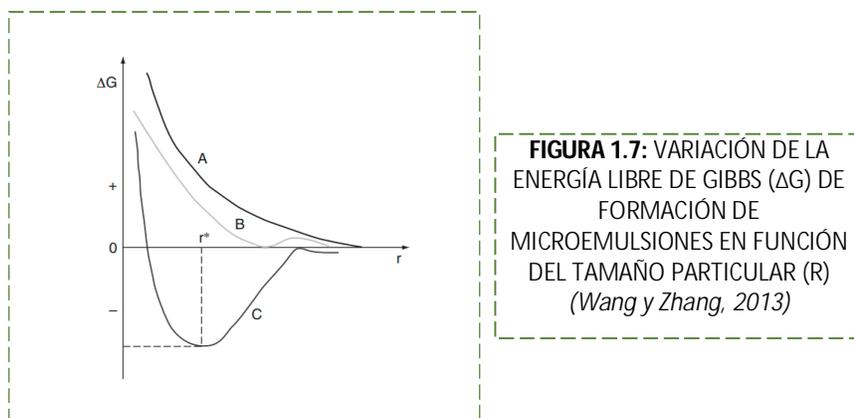
Ruckenstein y Chi en 1977 definieron el cambio en la Energía Libre de Gibbs para una microemulsión a partir de la contribución de 3 variaciones en la Energía Libre de Gibbs.

ΔG_1 = Incluye término positivo consecuencia de la carga de la interfase y un término negativo debido a la formación de una doble capa eléctrica.

ΔG_2 = es la energía libre de interacción entre las gotas, comprende un término negativo asociado a interacciones Van der Waals y un término positivo debido a interacciones repulsivas entre las doble capa.

ΔG_3 = determinado por la entropía del sistema debido a la dispersión de las gotas de la microemulsión en la fase continua (Wang y Zhang, 2013).

La competencia entre estos términos contribuye a los cambios de Energía Libre del sistema. Cuando ΔG es negativo ocurre formación espontánea de las microemulsiones; cuando es positivo puede tener lugar la formación de emulsiones, que aunque sean termodinámicamente inestables pueden ser cinéticamente estables (Mehta y Kaur, 2011; Ruckenstein, 1993).



En la Figura 1.7 se muestra el ΔG en función del radio de la gota (R). Las curvas A y B corresponden a emulsiones inestables ya que el mínimo de energía libre del sistema ocurre a R infinito y se obtiene tras la separación de fases.

No obstante, la curva B representa sistemas cinéticamente estables dado que, como se observa en el gráfico, previo a la separación de fases debe superarse una barrera energética.

La curva C muestra una microemulsión con el tamaño de nanogota más estable (R^*), que puede formarse a ΔG mínimo negativo. Las microemulsiones estables se forman cuando la tensión interfacial es menor a 2×10^{-2} mN/m (Wang y Zhang, 2013).

Desde un punto de vista termodinámico más simple, la Energía libre de Gibbs asociada a la formación de microemulsiones estará determinada por un balance entre el incremento del área (ΔA), la disminución de la tensión interfacial aceite/agua debido a la presencia de surfactantes (γ) y la reducción de energía atribuible al aumento de la entropía (ΔS) (*Grassi et al, 2007*).

$$\Delta G = \gamma \Delta A - T \Delta S$$

ΔG = Energía libre de Gibbs $\gamma \Delta A$ =Energía Interfacial

γ : Tensión de la interfase aceite/agua

ΔA : El cambio en el área interfacial tras la microemulsificación

ΔS = Entropía, cambio en la entropía debido a la dispersión de la fase interna (*Tadros, 2005*).

El proceso de formación de las microemulsiones estaría acompañado por una contribución entrópica positiva (ΔS) debido a la mezcla de las dos fases inmiscibles, al movimiento de las moléculas de surfactante hacia la interfase y al intercambio monómero de surfactante-micela. De este modo, tras la dispersión el número de gotas aumenta y el cambio en la entropía resulta positivo.

En las macroemulsiones $\gamma \Delta A \gg - T \Delta S$ y $\Delta G > 0$. Se trata de sistemas no espontáneos, que requieren de aporte energético para la formación de las gotas de la emulsión siendo termodinámicamente inestables.

En las microemulsiones $\gamma \Delta A < - T \Delta S$ y $\Delta G < 0$. El sistema se forma espontáneamente y es termodinámicamente estable (*Tadros, 2005*). En este tipo de formulaciones, el surfactante logra reducir la tensión interfacial a valores suficientemente bajos de forma tal que la energía interfacial positiva (determinada por $\gamma \Delta A$, donde A es el área interfacial) resulta compensada por la energía libre negativa debido a la mezcla de los componentes ($-T \Delta S$).

Para la obtención de valores de tensión interfacial muy bajos, capaces de promover la formación de microemulsiones, suele ser necesario incluir en la fórmula un segundo anfifilo (el cosurfactante, por ejemplo: un alcohol de cadena corta). Este compuesto se incorporará al film interfacial que rodea a las gotas (*Attwood y Florence, 2008*).

TEORÍA DE LOS FILMS MIXTOS

El film (constituido por moléculas de surfactante y co-surfactantes) se considera como una tercera fase líquida “bidimensional” en equilibrio con las fases agua-aceite.

Esta monocapa puede comportarse como un doble film, capaz de aportar diferentes propiedades a las superficies que se encuentran en contacto con el agua y aceite.

El film tendrá tensiones variables dependiendo de la región de contacto (agua o aceite). Esto se debe a diferencias de empaquetamiento de los grupos hidrófobos e hidrófilos (los que son desiguales en tamaño y áreas de sección transversal).

Resulta conveniente definir a la tensión superficial bidimensional de la siguiente forma:

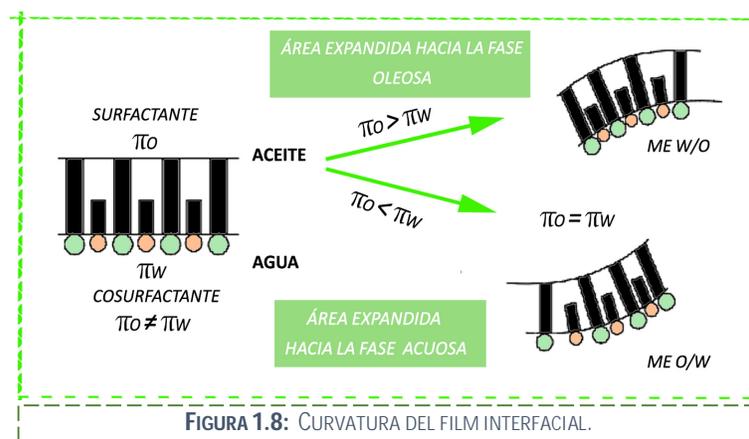
$$\pi = \Delta\sigma - \Delta (2)$$

Donde $\Delta\sigma$ es la tensión interfacial en ausencia de surfactante y Δ es la tensión interfacial una vez adsorbido el surfactante a la interfase.

Podrían definirse dos valores de tensión: tensión de la región del film-fase acuosa π_w y la tensión del film-fase oleosa π_o , las cuales son diferentes.

Como resultado de la diferencia de tensiones, la delgada película se curvará hasta igualar las tensiones a ambos lados ($\pi_o = \pi_w$). Si $\pi_o > \pi_w$, el área del film en contacto con la fase oleosa deberá expandirse hasta igualar las tensiones ($\pi_o = \pi_w$) resultando en una reducción de π_o , dando lugar a la formación de una microemulsión w/o.

Sin embargo, si $\pi_w > \pi_o$, la región en contacto con el agua es la que debe expandirse hasta igualar las tensiones. En este caso se obtiene, por tanto, una microemulsión o/w, véase Figura 1.8 (Tadros, 2005).



La teoría del film, puede explicar la naturaleza de la microemulsión: la tensión superficial a cada lado de la interfase depende de las porciones hidrófobas e hidrófilas de las moléculas de surfactantes. Si los grupos hidrófobos son más voluminosos que los hidrófilos, los primeros tenderán a agruparse promoviendo una tensión superficial más alta en la región del aceite. Esto resulta en una expansión de la fase oleosa que da lugar a la formación de una microemulsión w/o. En cambio, si los grupos hidrófilos son más voluminosos se forman microemulsiones o/w (*Wang y Zhang, 2013*).

TEORÍA DE LA SOLUBILIZACIÓN

Esta teoría considera a las microemulsiones como sistemas micelares hinchados en donde el aceite o el agua se incorporan a la estructura de la micela directa o inversa formando sistemas monofásicos termodinámicamente estables (*Shinoda y Kuneida, 1973*).

Existen varias teorías respecto de la formación de las microemulsiones, sin embargo, aquella que incluye conceptos relacionados con la reducción de la energía libre interfacial hasta valores mínimos, es la de mayor importancia (*Shinoda y Kuneida 1973, Shinoda y Lindman 1987*).

MICROEMULSIONES – CLASIFICACIÓN:

Existen diferentes tipos de microemulsiones:

- **Microemulsiones o/w:** nanogotas de aceite dispersas en agua. En este tipo de sistemas la fracción del volumen de aceite es baja.
- **Microemulsiones w/o:** nanogotas de agua en aceite, en donde la fracción del volumen de agua es baja.
- **Microemulsiones bicontinuas:** las cantidades de agua y aceite son similares. En este caso particular, ambos, el aceite y el agua existen como una fase continua en presencia de una interfase que fluctúa constantemente y es estabilizada por el surfactante con una curvatura final de cero (*Nagarajan y Ruckenstein, 2000*), véase Figuras 1. 9 y 1.10.

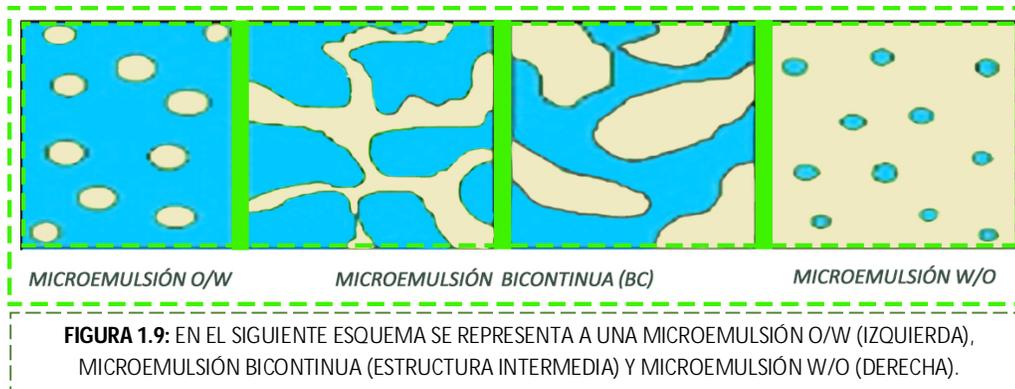


FIGURA 1.9: EN EL SIGUIENTE ESQUEMA SE REPRESENTA A UNA MICROEMULSIÓN O/W (IZQUIERDA), MICROEMULSIÓN BICONTINUA (ESTRUCTURA INTERMEDIA) Y MICROEMULSIÓN W/O (DERECHA).

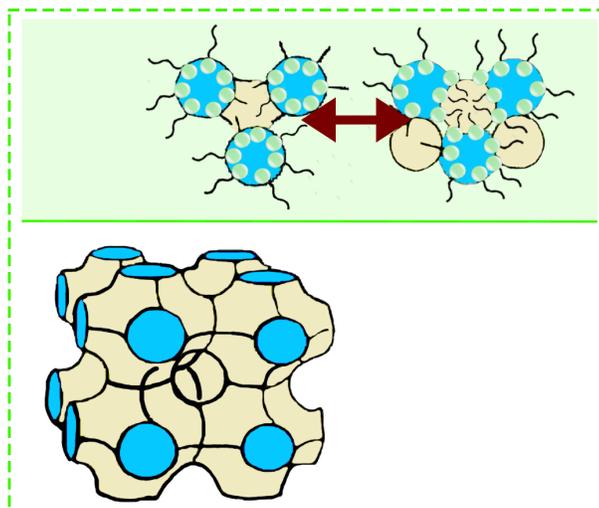


FIGURA 1.10: MICROEMULSIÓN BICONTINUA

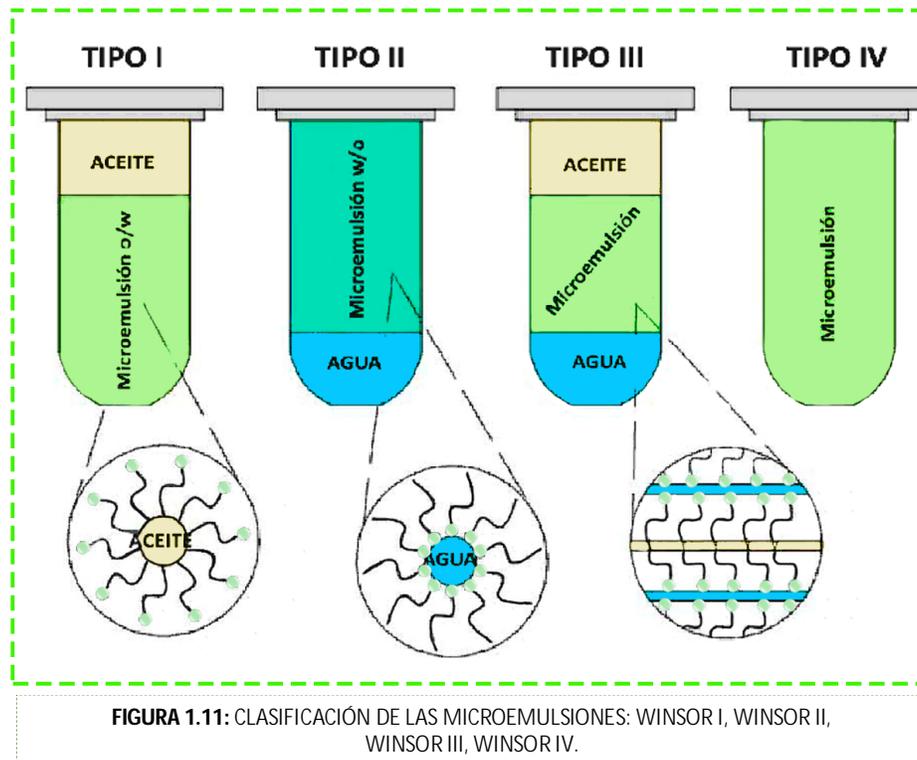
En función de la formulación, estos sistemas agua - aceite - surfactante presentan, al equilibrio, una o varias fases, clasificándose según lo detallado a continuación, véase Figura 1.11:

Winsor I: dos fases, la inferior consiste en una microemulsión (o/w) en equilibrio con un exceso de fase oleosa (región superior).

Winsor II: dos fases, la superior consiste en una microemulsión w/o que se encuentra en equilibrio con un exceso de fase acuosa (región inferior).

Winsor III: tres fases, una microemulsión en equilibrio a la vez con un exceso de fase oleosa (región superior) y un exceso de fase acuosa (región inferior) quedando situada la microemulsión bicontinua en la región central.

Winsor IV: una única fase en donde aceite, surfactantes y agua se mezclan de modo homogéneo también conocida como *microemulsión discreta* (Du, Lucia y Ghiladi, 2016; Misra et al 2011), véase Figura 1.11.



DISEÑO DE MICROEMULSIONES DE APLICACIÓN FARMACÉUTICA - SELECCIÓN DE LOS COMPONENTES

La formulación de microemulsiones, incluye la combinación de 3 a 5 componentes: aceite, agua, surfactantes, co-surfactante (optativo). La selección de estos compuestos representa un gran desafío dado que, en su mayoría, los empleados en investigación suelen presentar problemas de biocompatibilidad.

SURFACTANTES/EMULGENTES

Los tensioactivos, constituyen un grupo muy numeroso. Su clasificación se suele realizar teniendo en cuenta las características de la porción polar de la molécula.

Así, el primer grupo de surfactantes incluye aquellos cuya cabeza polar puede ionizarse (tensioactivos iónicos) y que a su vez se clasifican en: aniónicos, catiónicos y anfóteros. El segundo gran grupo, está conformado por aquellos cuya porción polar no se puede ionizar y se denominan tensioactivos no iónicos (*Tadros, 2005*).

En textos del *Handbook of Surfactants* surge una cuarta clase, que incluye a los tensioactivos poliméricos ampliamente utilizados para la preparación y estabilización de emulsiones y suspensiones (Porter, 1991).

Al momento de diseñar una microemulsión la selección de los surfactantes es crítica dado que favorecen la microemulsificación de la fase oleosa. Lamentablemente, existe un número reducido de agentes emulsificantes y cosurfactantes disponibles para el desarrollo de estos sistemas de aplicación farmacéutica, siendo escasa la cantidad excipientes aceptados como seguros para su uso en humanos (Porter, 1991).

Para formular microemulsiones farmacéuticamente aceptables deben emplearse como adyuvantes componentes de grado farmacéutico, es decir, que ya se encuentren en uso en las formulaciones farmacéuticas y que carezcan de efectos tóxicos en los seres humanos (FDA, 2001).

Los tensioactivos no iónicos y los anfóteros, son los más utilizados en este tipo de fórmulas (Tenjarla, 1999). Entre la gama de tensioactivos no iónicos más empleados se encuentran los éteres de alquilo de polioxietileno (Malcolmson et al, 1998) y sus derivados (Tweens y Spans) aceite de ricino hidrogenado de polioxietileno (Kunied et al, 1996) (Cremophor RH), aceite de ricino polioxietilénico (Cremophor EI).

Los surfactantes no iónicos suelen cumplir con las propiedades de baja toxicidad y biocompatibilidad. Entre otras ventajas, se incluyen: falta de sensibilidad a cambios en el pH (importante si son necesarios ajustes de pH de la formulación para favorecer la actividad del fármaco) y ausencia de interacciones ante la presencia de electrolitos (Delgado Charro, Otero Espinar y Blanco Méndez, 2001).

MECANISMOS DE ACCIÓN DE LOS SURFACTANTES/EMULGENTES

Los compuestos químicos comúnmente empleados como emulsificantes se pueden dividir en tres categorías: agentes surfactantes, coloides hidrófilos y sólidos finamente divididos, los cuales reducen la tensión interfacial y actúan como barreras para la coalescencia de las gotas al adsorberse sobre sus superficies. Dichos compuestos contribuyen a la formación de sistemas dispersos a partir de los mecanismos detallados a continuación:

DISMINUCIÓN DE LA TENSIÓN INTERFACIAL – ESTABILIZACIÓN TERMODINÁMICA: la adsorción de surfactantes disminuye la tensión interfacial entre los dos líquidos inmiscibles. Asimismo, una reducción de las fuerzas de atracción entre las moléculas que constituyen la fase dispersa disminuye la energía libre del sistema evitando la coalescencia o separación de fases (*Jain, Ahmed y Khar, 2012*).

FORMACIÓN DE UN FILM INTERFACIAL O BARRERA MECÁNICA: el emulgente adsorbido en la interfase rodea a las gotas dispersas formando films monomoleculares o multilamelares los cuales evitan el fenómeno de coalescencia ante la aproximación de las mismas. La estabilidad de la emulsión dependerá del film formado en la interfase, el cual varía en estructura conforme a la clase de emulgente empleado (*Jain, Ahmad y Khar, 2012*).

ESTABILIZACIÓN ELECTROSTÁTICA: para que ocurra coalescencia las gotas de una emulsión deben estar en contacto unas con otras. Este fenómeno, conocido como floculación, puede evitarse a través de la separación de las mismas mediante repulsión entre las superficies cargadas. Los surfactantes iónicos y algunos biopolímeros (coloides hidrófilos) con actividad superficial como proteínas, polisacáridos y sus complejos, pueden proveer estabilidad electrostática a las emulsiones, debido al efecto repulsivo que genera el potencial de la doble capa eléctrica presente sobre la superficie de las gotas.

Este tipo de interacciones dependerá de la concentración de emulgente, del pH y de la fuerza iónica de la solución (*Dickinson 1989, Dickinson 1998, Dickinson y Stainsby, 1988, Jain, Ahmad y Khar, 2012*).

ESTABILIZACIÓN ESTÉRICA: esto se produce por la presencia de tensioactivo y/o capas de polímeros adsorbidos. Estas capas se extenderán desde la superficie de la partícula o gota hasta cierta distancia en la solución. Siempre que estos films estén fuertemente solvatados por las moléculas del medio, producen repulsión y como resultado no se favorece la interacción entre las cadenas. Cuando dos partículas o gotas se aproximan a una distancia de separación (h) menor al doble del grosor de la capa adsorbida (2 d),

puede producirse una superposición y/o compresión de los films, lo que da como resultado fuerzas de repulsión. Adicionalmente, cuando los films de surfactantes comienzan a solaparse las cadenas pierden entropía configuracional, lo que resulta en una repulsión adicional.

La combinación del solapamiento y de la repulsión entrópica, genera un fuerte efecto estérico de repulsión que contrarresta a las fuerzas de atracción de Van der Waals, particularmente a distancias inferiores a $2d$ (Tadros, 2005).

Las moléculas más eficaces para éste propósito son los copolímeros de bloque (tensioactivos no iónicos).

COTENSIOACTIVOS

Un aspecto importante a tener en cuenta al momento de diseñar una fórmula farmacéutica es la toxicidad del sistema portador del fármaco. En lo que respecta a las microemulsiones, la principal preocupación es también la toxicidad asociada al uso de cosurfactantes.

La mayoría de estos compuestos no pueden aplicarse a nivel farmacéutico debido a la escasa biocompatibilidad que presentan. Entre los co-surfactantes farmacéuticamente aceptables se encuentran el etanol, alcoholes de cadena media, mono y diglicéridos, 1-2 alcanodíoles y combinaciones sucrosa etanol. Por lo general, los alcoholes de cadena corta y media suelen presentar problemas de toxicidad y ofrecen desventajas para las microemulsiones que los contienen (Alany y Wen, 2008).

En los sistemas basados en Surfactantes/Cosurfactante la principal limitación es que suelen desestabilizarse con la dilución de la fase externa (por ejemplo: luego de una aplicación biológica: vía oral, parenteral) promoviendo liberación abrupta del fármaco (riesgo de toxicidad) o incluso precipitación del mismo.

Cabe destacar, que ciertos autores demostraron que es posible formular microemulsiones o/w de aplicación farmacéutica libres de co-surfactantes empleando surfactantes no iónicos (Alany y Wen, 2008).

FASE APOLAR

La selección de una adecuada fase apolar es muy importante principalmente porque influencia la estabilidad de la microemulsión y en segundo lugar resulta necesaria para solubilizar el fármaco hidrófobo que se pretende administrar.

Los aceites de cadena corta son preferibles a los de cadena hidrocarbonada larga puesto que penetran en las zonas más profundas de la región hidrófoba, formada por las cadenas hidrocarbonadas de los surfactantes, promoviendo la estabilidad del film interfacial necesaria para la formación de la microemulsión. En general, los aceites de cadena más corta (o de bajo peso molecular), tales como triglicéridos de cadena media o ésteres de ácidos grasos (oleato de etilo), resultan fáciles de microemulsificar.

No obstante, la capacidad del aceite para solubilizar fase orgánica se incrementa con el largo de la cadena. De este modo, la selección de la fase oleosa está generalmente determinada por el compromiso entre la habilidad para solubilizar al fármaco y la capacidad para formar microemulsión. En algunos casos se utiliza una mezcla de varios aceites para cumplir con ambos requisitos (*Peng et al, 2011*).

FASE ACUOSA

Generalmente constituida por soluciones salinas (NaCl 0,9%) o solución de dextrosa al 5% a los fines de cumplir con el requisito de isotonicidad y buffers (*He, He y Gao, 2010*).

OTROS FACTORES A TENER EN CUENTA AL MOMENTO DE PREPARAR LA MICROEMULSIÓN

CONCENTRACIÓN DE SURFACTANTES

Para formar la microemulsión deben considerarse al menos 2 aspectos:

Los surfactantes deben seleccionarse cuidadosamente, de forma tal de lograr en la interfase una tensión interfacial ultra baja ($<10^{-3}$ mN/m), lo cual es primordial para la formación de la microemulsión.

La concentración de surfactantes en las microemulsiones suele ser usualmente elevada (30-60%) (*Misra et al, 2010*), 10-40% según otros autores (*Bagwe et al, 2001*).

CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS DEL ACEITE

Las moléculas de aceite deben interpenetrar y asociarse con la película interfacial. Para formar microemulsiones el aceite debe ser estructuralmente semejante a los emulgentes y de igual o menor longitud de cadena hidrocarbonada (*Peng et al, 2011*).

FACTORES DETERMINANTES DE MICROEMULSIONES O/W Y W/O

BHL: Griffin, en 1949, propuso un índice numérico con el que se indica el predominio de las características hidrófilas o lipófilas del emulgente. Este número constituye el Balance Hidrófilo Lipófilo del emulgente (BHL).

La escala de Griffin proporciona valores numéricos de 1 a 20, tomando como referencia el oleato sódico puro (BHL 20) (compuesto completamente soluble en agua) y el ácido oleico puro (BHL 1) compuesto completamente insoluble en agua.

Los valores de este parámetro tienen en cuenta la contribución relativa de la porción hidrófila e hidrófoba de la molécula de surfactante (*Delgado Charro, Otero Espinar y Blanco Méndez, 2001; Porter, 1991*).

El rol del surfactante en el tipo de emulsión formada, puede explicarse a partir de la regla de Bancroft la cual establece que: *la fase en la cual el surfactante es más soluble, constituirá la fase continua de la emulsión*. Los tensioactivos con valores de BHL bajos (3-6) son lipófilos. Los que presentan valores superiores (9-12) son hidrófilos.

Así, generalmente se acepta que surfactantes cuyos valores de BHL rondan entre 3-6 favorecerán la formación de microemulsiones w/o. Sin embargo, surfactantes que presenten valores de BHL superiores, formarán preferentemente microemulsiones o/w (*Constantinides, 1995; Zheng et al, 2015*).

PARÁMETRO DE EMPAQUETAMIENTO: P_c

Anteriormente se han representado las posibles microestructuras correspondientes a las microemulsiones o/w, w/o y bicontinua. La teoría de la geometría de estos sistemas fue introducida por Robbins. En su opinión, para producir microemulsiones, el tamaño de los grupos hidrófilos e hidrófobos de las moléculas de surfactantes debe balancearse correctamente en función de la solución acuosa y del aceite.

Estos grupos determinarían el tipo de microemulsión (o/w, w/o o bicontinua) a través de su influencia en el parámetro de empaquetamiento molecular y en la curvatura del film. Dicho parámetro define la curvatura espontánea de la interfase la cual está determinada por la disposición geométrica y las fuerzas interfaciales del agente tensioactivo (*Wang y Zhang, 2013*).

El parámetro de empaquetamiento puede calcularse usando la siguiente ecuación, véase Figura 1.12.

$$P_c = V / (A_o L_c)$$

V= volumen de las cadenas hidrocarbonadas por anfifilo

A_o= área óptima por cabeza polar

L_c= longitud de la cadena alquílica extendida

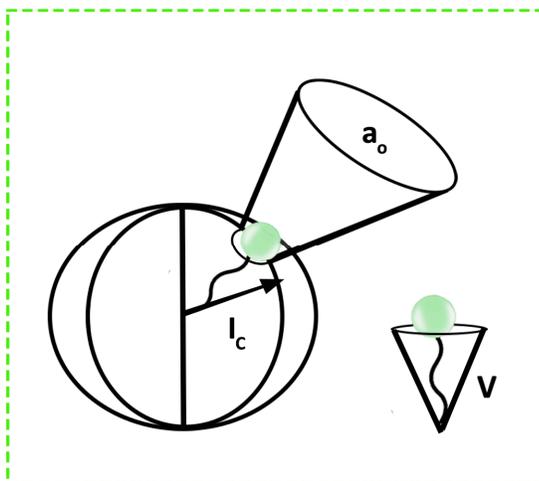


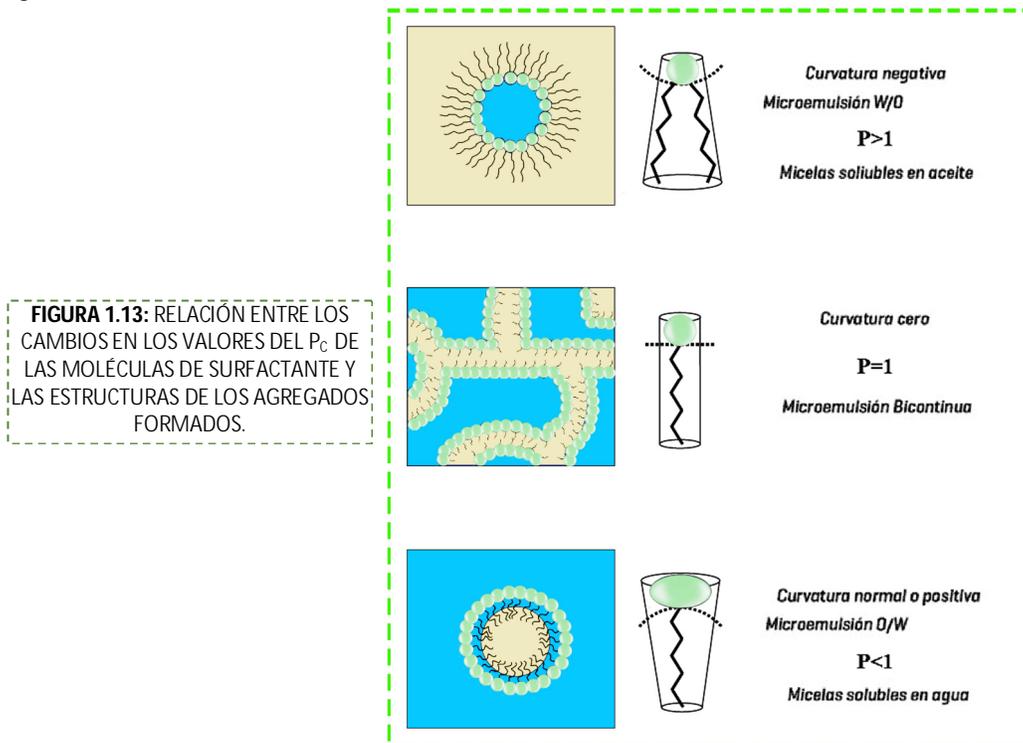
FIGURA 1.12: EL PARÁMETRO DE EMPAQUETAMIENTO CRÍTICO RELACIONA EL ÁREA DE LA CABEZA POLAR CON LA LONGITUD Y EL VOLUMEN DE LA PARTE HIDROFÓBICA DE LA MOLÉCULA DE SURFACTANTE.

Si la cabeza polar es más voluminosa que la porción hidrofóbica ($P_c < 1$), se formarán estructuras del tipo o/w. La interfase se curva en la dirección del agua.

Las estructuras del tipo w/o se forman cuando la interfase se curve hacia el sitio opuesto ($P_c > 1$).

Cuando $P_c = 1$, la curvatura del film es igual a cero, pudiéndose formar estructuras bicontinuas o cristales líquidos de acuerdo con la rigidez del film.

A continuación se representa la correlación existente entre la estructura geométrica del surfactante y la curvatura espontánea de la interfase (*Wang y Zhang, 2013*), véase Figura 1.13.



PREPARACIÓN DE LAS MICROEMULSIONES

Las microemulsiones son termodinámicamente estables, por lo tanto pueden obtenerse tras la simple combinación de sus componentes, aceite, agua, surfactante y cosurfactante bajo condiciones de agitación moderada.

En general, la fase dispersa se mezcla junto a los tensioactivos y se añade progresivamente la fase continua. La solución en primera instancia se observa traslúcida pero a los pocos minutos adquiere la claridad óptica característica.

Los surfactantes no iónicos deben disolverse primero en agua. De todos modos, el orden de mezcla de los componentes no se considera como factor crítico dado que estos sistemas presentan formación espontánea (Rosano, Cavello y Lyons, 1987).

Para la obtención de las microemulsiones sólo se requiere un equipamiento básico que facilite la dosificación de la fase continua y la agitación de los componentes de la mezcla tras la titulación (Ghosh, 2006).

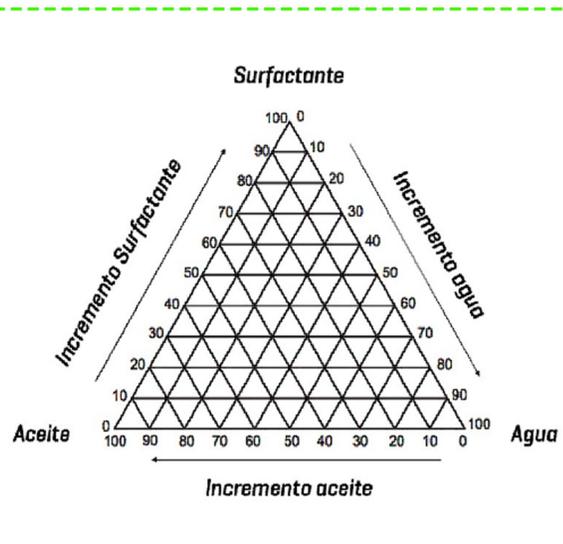
CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA DE LAS MICROEMULSIONES

ESTUDIO DEL COMPORTAMIENTO DE FASES

Previo a la utilización de una microemulsión como vehículo portador de fármacos, debe establecerse el comportamiento de fases de la combinación de los componentes. Esto resulta necesario dado la amplia variedad de estructuras (emulsiones, cristales líquidos, vesículas, microemulsiones y demás sistemas coloidales) que pueden obtenerse tras la mezcla de aceite, agua, anfifilo.

Uno de los métodos más apropiados para estudiar el comportamiento de fases de estos sistemas, consiste en la construcción de un diagrama de fases ternario empleando el triángulo de Gibbs, en el cual cada vértice del diagrama representa el 100% de cada componente en particular (Alany y Wen, 2008), véase Figura 1.14.

FIGURA 1.14: ESQUEMA DE UN DIAGRAMA DE FASE TERNARIO DE SISTEMAS – ACEITE – SURFACTANTE – AGUA. UNA MICROEMULSIÓN O/W SE FORMA CUANDO LA CONCENTRACIÓN DE ACEITE ES BAJA. UNA MICROEMULSIÓN W/O SE FORMA CUANDO LA CONCENTRACIÓN DE AGUA ES BAJA Y UNA MICROEMULSIÓN BICONTINUA SE FORMA CUANDO LA CONCENTRACIÓN DE ACEITE Y AGUA SON IGUALES. DEPENDIENDO DE LA CONCENTRACIÓN DE LOS COMPONENTES Y DE OTRAS CARACTERÍSTICAS, UNA GRAN VARIEDAD DE ESTRUCTURAS INTERNAS PUEDEN FORMARSE ADEMÁS DE LOS SISTEMAS DEL TIPO MICROEMULSIONES (Alany y Wen, 2008).



Para combinaciones de cuatro o más componentes, se utilizan diagramas de fases pseudoternarios en donde típicamente uno de los vértices representa una mezcla

binaria de 2 componentes tales como (surfactante/co-surfactante; aceite/fármaco o agua/fármaco). El número de fases presentes para una mezcla particular puede ser evaluado visualmente.

Las características microestructurales deben, además, ser investigadas con la ayuda de más de una técnica apropiada (*Alany y Wen, 2008*).

El diagrama de fases pseudoternario puede ser construido de 2 formas:

- 1) *titulando una mezcla de dos componentes con un tercero.*
- 2) *preparando un gran número de muestras de diferente composición.*

Cualquiera de los dos métodos resulta útil para muestras que alcanzan rápidamente el equilibrio. No obstante, en el método de titulación, el cambio en la proporción de los componentes ocurre velozmente y no da tiempo suficiente para reconocer visualmente los cambios de fase. Consecuentemente, la segunda opción es la recomendada si se trata de sistemas que no logran alcanzar rápidamente el equilibrio (*Alany y Wen, 2008*).

Dadas las características de los sistemas obtenidos, los diagramas de fases se han realizado conforme al método de titulación. Asimismo, como son más de cuatro los componentes estudiados, se emplearon diagramas de fase pseudoternarios, donde típicamente uno de los vértices, se corresponde con una mezcla ternaria de componentes (*Sinko y Singh, 2011*).

Los diagramas, se han construido manteniendo constante la relación de los surfactantes y variando los otros dos componentes. Para simplificar, se han graficado "líneas de dilución" que representan un incremento en el contenido de agua y una disminución en los niveles de los otros componentes.

Las líneas se han dibujado desde el vértice correspondiente a 100% de la mezcla de surfactantes hasta el extremo opuesto (100% de aceite). Cada línea fue arbitrariamente denotada con el valor correspondiente a su intersección con la escala del aceite. De este modo, se graficaron líneas (20:80; 30:70; 40:60 etc).

Las muestras que presentaron turbidez seguida de separación de fases, fueron consideradas como bifásicas. Las muestras claras y transparentes (que mostraron valores mínimos de turbidez) se apartaron como monofásicas a fin de ser posteriormente analizadas por microscopía electrónica de luz polarizada.

Las muestras del tipo microemulsión, fueron graficadas como puntos en el diagrama y el área cubierta por esos puntos se delimitó como “Región de Existencia de Microemulsiones”.

RECONOCIMIENTO DE LAS MICROEMULSIONES

PROPIEDADES ÓPTICAS

Las partículas que son grandes comparadas con la longitud de onda de la luz (λ), la reflejan y refractan, mientras que las que presentan menor tamaño, la dispersan en todas las direcciones, polarizada en un plano.

Con luz visible (λ entre 400 y 700 nm) las partículas grandes se ven blanco mate, mientras que las pequeñas aparecen azules a la luz reflejada y rojo naranja a la luz transmitida, comportamiento conocido como *Dispersión Tyndall*.

Así, las emulsiones (tamaño particular superior a 500 nm), no poseen *efecto Tyndall* y se visualizan de color blanco mate, presentando aspecto lechoso. Sin embargo, las microemulsiones que no son transparentes, exhiben una fuerte *dispersión Tyndall* que puede observarse a simple vista. De este modo, si se coloca la muestra en un tubo de ensayo y se la expone a una fuente luminosa fuerte (preferentemente el sol) podrá estimarse el tamaño particular atendiendo al comportamiento a la luz reflejada y transmitida, según se detalla a continuación (Fletcher y Morris, 1995; Rao y Mc. Clemments, 2011; Sinko y Singh, 2011):

COLOR DEL SISTEMA	LUZ REFLEJADA	LUZ TRANSMITIDA	TAMAÑO PARTICULAR
BLANCO A GRIS	AZÚL CLARO	ROJO CLARO	100 - 300 NM
GRIS O TRASLÚCIDO	AZÚL INTENSO	ROJO INTENSO	10 - 140 NM
CLARO - TRANSPARENTE	NO REFLEJA COLOR	NO TRANSMITE COLOR	<25 NM

MICROSCOPIA

Cuando una mezcla de aceite, agua y surfactantes, se examina bajo luz polarizada, las texturas que se observan dependerán de la naturaleza de los agregados formados y de la proporción relativa de los constituyentes.

Los sistemas que presentan anisotropía, mostrarán una fuerte birrefringencia y texturas particulares, que podrán visualizarse utilizando un microscopio de luz polarizada. En contraste, los materiales ópticamente isotrópicos (las microemulsiones) no muestran birrefringencia, no interfieren con la luz polarizada y, a diferencia de lo que ocurre ante la presencia de otros sistemas, el campo visual permanece oscuro. Esta técnica permite, por lo tanto, diferenciar a los cristales líquidos y otros tipos de estructuras que a simple vista podrían llegar a confundirse con las microemulsiones. Consecuentemente resulta imprescindible, complementar las observaciones macroscópicas (aparición visual) con la microscopía óptica de luz polarizada (*Alany y Wen, 2008*).

MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN

Las microemulsiones pueden ser caracterizadas mediante técnicas de microscopía electrónica. La microscopía electrónica se utiliza para el estudio de las microestructuras.

Los sistemas, podrán observarse luego de tratamientos químicos o térmicos. Se ha reportado que la observación directa de la microemulsión (secada al aire) sobre una grilla, funciona como herramienta útil para el análisis de la microestructura y tamaño de la fase interna.

La microscopía electrónica de crio-fractura, se emplea también para el estudio de la estructura de las microemulsiones. El congelamiento extremadamente rápido de la muestra permite mantener la estructura minimizando modificaciones y alteraciones del sistema. De este modo, a diferencia de los inconvenientes generados por la técnica anterior, lo que se visualiza siempre es representativo de la microestructura real del sistema (*Grassi et al, 2007*).

ESTUDIOS DE ESTABILIDAD

El criterio real de identificación de una microemulsión no es el tamaño de las partículas sino su estabilidad. Las técnicas para determinar el comportamiento de las partículas pequeñas en un campo gravitacional, su velocidad de sedimentación, proveen una identificación rápida de la microemulsión.

La estabilidad de estos sistemas se determina mediante estudios de estabilidad acelerada y a largo plazo. En estos últimos ensayos, la microemulsión se almacena a temperatura ambiente y a temperatura de refrigeración. Durante ese período de tiempo los sistemas se evalúan en cuanto al tamaño de la fase dispersa, viscosidad, pH, y conductividad (*Nornoo y Chow, 2008*).

Los ensayos de estabilidad acelerada constituyen herramientas esenciales para el estudio de la estabilidad termodinámica de las microemulsiones. Esto puede realizarse mediante centrifugación, ciclos de calentamiento/enfriamiento, ciclos de congelamiento/descongelamiento. En lo que respecta a la centrifugación, el sistema estaría sujeto a centrifugación a 822 g durante 30 min, observándose si hay o no separación de fases (*Shakeel et al, 2007*).

Los ciclos de calentamiento/enfriamiento consisten en almacenar al sistema a temperaturas de 4 y 45 °C, durante un período de tiempo no inferior a 48 h por ciclo.

Los ciclos de congelamiento/descongelamiento de la microemulsión, pueden realizarse entre -21 °C y 25°C o entre 5°C y 10°C (*Shakeel et al, 2007*).

DYNAMIC LIGHT SCATTERING (DLS)

Es también conocida como Espectroscopía de correlación fotónica (PCS) y analiza las fluctuaciones en la intensidad de dispersión de la radiación debido al movimiento Browniano de las gotas. Se emplea para la determinación del tamaño particular (*Lu y Gao, 2010*).

DLS también puede ser usado para la *medición del índice de polidispersión (PDI)* que es una medida de la *desviación estándar del tamaño particular promedio*.

Valores de PDI entre 0,1 y 0,25 indican una distribución de tamaño pequeña (sistemas monodispersos); valores superiores a 0,5 son indicadores de una amplia distribución (Patel et al, 2009).

El PDI, constituye otro factor capaz de influenciar la forma, estabilidad y performance de un sistema nanométrico. Así, los sistemas monodispersos son preferibles para el desarrollo de sistemas de liberación controlada de fármacos (*Mandal et al, 2017*).

ESTUDIOS DE CONDUCTIVIDAD

Las mediciones de conductividad proveen información acerca de la estructura y comportamiento de la microemulsión. La técnica se usa por lo general, para determinar la naturaleza de la fase continua (*Kahlweit et al, 1987*).

La conductividad eléctrica de las microemulsiones, emulsiones y cristales líquidos puede exhibir valores máximos o mínimos en función de la relación aceite/agua, lo que refleja cambios en la movilidad de los iones como consecuencia de la viscosidad del medio (*Shah y Hamlin, 1971*).

Las microemulsiones o/w arrojan valores elevados de conductividad (lo que determina que la fase externa es acuosa) mientras que, las microemulsiones w/o, como consecuencia de la naturaleza oleosa de la fase continua, muestran valores bajos de conductividad (*Grassi et al, 2007*).

Una característica particular de los sistemas o/w es el marcado aumento de la conductividad eléctrica a medida que aumenta la concentración de agua (*Alany et al, 2009*). Este cambio repentino se ha atribuido a la percolación de las gotas de fase interna en el aceite (fase externa) (*Lagourett et al, 1979*).

De este modo, la conductividad se mantiene baja hasta cierta fracción de volumen de agua (debido a la naturaleza no conductora de la fase continua del sistema w/o). Sin embargo, tras la adición de una mayor cantidad de agua, el volumen de la fase interna alcanza e incluso excede el umbral de percolación (ϕ_p). Así, algunas de estas gotas conductoras comienzan a contactarse unas con otras formando "clusters". Se provoca entonces, una fusión transitoria de gotas resultando esto en un movimiento eficiente de los iones a través de las gotas dispersas con el consecuente aumento exponencial de la conductancia. Algunos autores reconocen esto como señal de formación de estructuras del tipo bicontinuas (*Kaler, Davis y Scriven, 1983; Saidi et al, 1990*).

Para el caso de la transición o/w a w/o, si bien la presencia de esta última estructura estaría determinada por valores bajos de conductividad, justo antes de la formación de

la microemulsión bicontinua también se observa el valor más alto de conductividad que estaría asociado al fenómeno explicado anteriormente (*Grassi et al, 2007*).

MICROEMULSIONES COMO VEHÍCULOS PORTADORES DE FÁRMACOS - GENERALIDADES

Si lo que se pretende es lograr liberación controlada de un fármaco de escasa solubilidad acuosa, éste debería incorporarse en la fase dispersa de una microemulsión o/w. No obstante, un compuesto soluble en agua debe ser incorporado en la fase dispersa de una microemulsión w/o.

A pesar de todas las posibles estructuras que pueden corresponder a una microemulsión, para dar aplicación farmacéutica, se prefiere el diseño de microemulsiones discretas (*Winsor Tipo IV*). Estos sistemas presentarían gran habilidad para el control de la liberación de fármacos (*Grassi et al, 2007*).

Referido a esto, cabe destacar que existe un fenómeno de partición del fármaco entre la gota de la microemulsión y la fase continua. Si bien puede haber una zona de preferencia dentro de la microestructura, la molécula activa puede localizarse en más de un sitio específico.

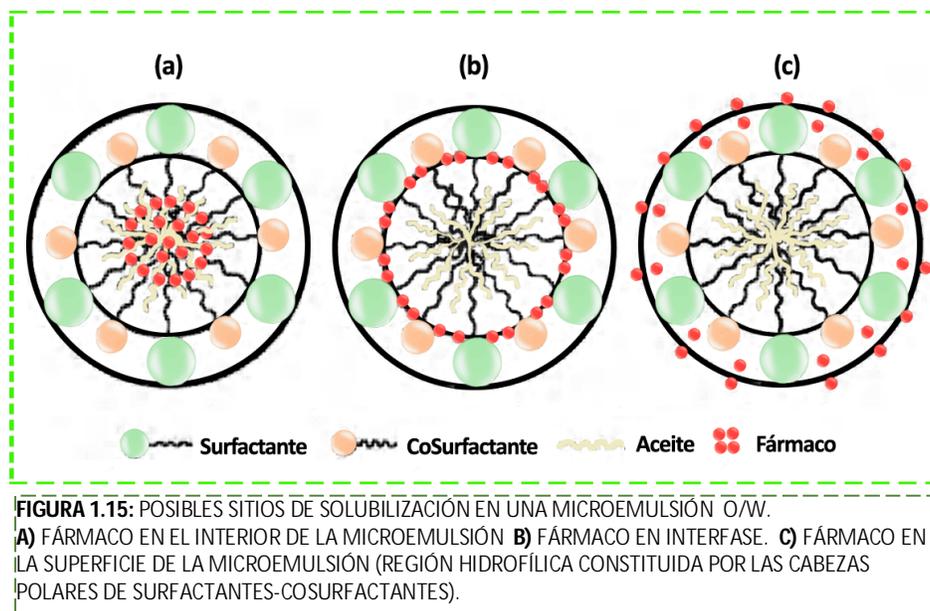
Como se observa en la Figura 1.15, los sitios probablemente preferidos para la incorporación de un compuesto lipófilo (fármaco insoluble/poco soluble en agua) en una microemulsión o/w son: la fase oleosa dispersa o la región conformada por las colas hidrófobas de las moléculas de surfactante (*Wang y Zhang, 2013*).

Resultaría interesante que el fármaco de escasa solubilidad acuosa, presentara mayor solubilidad en el aceite que en la región formada por las colas hidrófobas de las moléculas de surfactantes. Es decir, si el aceite constituye el microambiente de preferencia del fármaco la difusión desde la gota hacia el tejido blanco incluiría el pasaje a través de los dominios de alta polaridad (cabezas polares de las moléculas de surfactante/fase externa acuosa) los que actuarían como barreras para el transporte de los principios activos lipófilos. De este modo, en la microemulsión o/w, los fármacos hidrófobos solubilizados en las gotas de aceite, experimentan una liberación obstaculizada (la tasa de liberación se encuentra retardada) actuando la fase oleosa como reservorio (*Grassi et al, 2007*).

Cabe destacar, que en el campo farmacéutico, el uso de las microemulsiones o/w resulta menos problemático que el de las w/o. Esto se debe a que la estructura de la gota de aceite, en general, se mantiene estable tras dilución en un medio biológico (comportamiento que resultaría favorable y apropiado si lo que se pretende es la aplicación de la fórmula vía oral o parenteral).

Este efecto no se observa en las microemulsiones w/o. En estos casos, el aumento en la fracción o volumen de la fase dispersa disminuye la relación surfactante/agua lo cual se asocia con un crecimiento de la fase interna. En general, si la dilución con el medio biológico continúa, ocurre inversión e incluso separación de fases, perdiéndose las propiedades de la microemulsión original (Alany y Wen, 2008).

Justificadamente ocurre, entonces, que las microemulsiones w/o suelen emplearse para vías de administración en donde la dilución no resulta importante (ej: inyección intramuscular, administración en piel) (Grassi et al, 2007).



LIBERACIÓN SOSTENIDA DE FÁRMACOS: DINÁMICA DEL EQUILIBRIO MICELAR APLICADO A SURFACTANTES NO IÓNICOS POLIOXIETILÉNICOS

Las micelas se encuentran en proceso dinámico de disociación y asociación. Existen dos procedimientos propuestos para el equilibrio micelar (Jiao, 2008).

- a) Relajación rápida en la cual los surfactantes que constituyen las micelas se intercambian por los que se encuentran en solución circundante.
- b) Relajación lenta en donde las micelas se asocian y disocian continuamente, véase Figura 1.16.

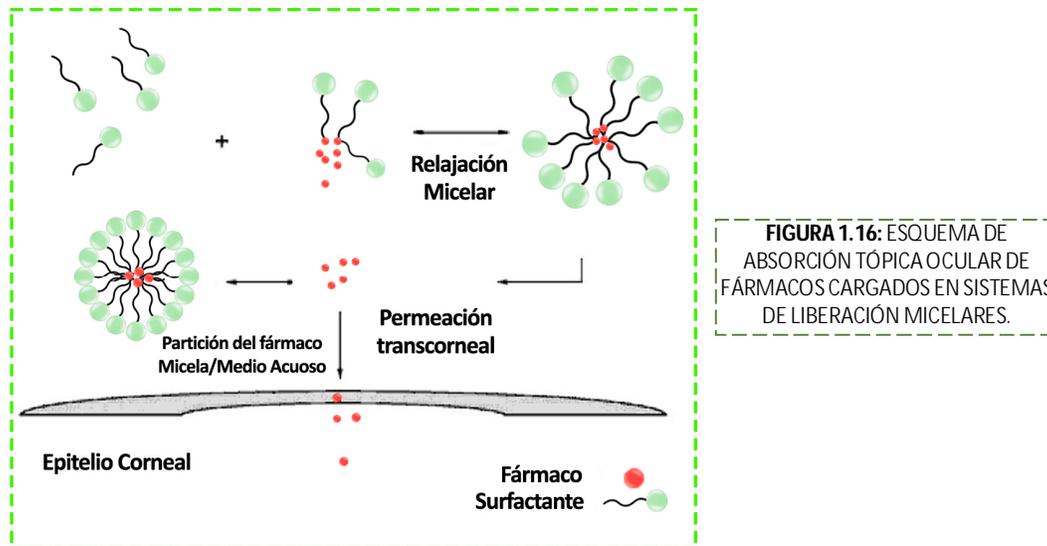


FIGURA 1.16: ESQUEMA DE ABSORCIÓN TÓPICA OCULAR DE FÁRMACOS CARGADOS EN SISTEMAS DE LIBERACIÓN MICELARES.

Referido a esto, existen diferentes posibilidades que permiten predecir el destino del fármaco situado a nivel precorneal teniendo en cuenta el tiempo de relajación micelar y la velocidad de partición del fármaco en micela/fluido circundante. De este modo, si el tiempo de relajación lento de la micela es corto y la partición del fármaco fuera y dentro de la misma es rápida a medida que el fármaco libre se absorbe, nuevo principio activo es liberado desde la micela. No obstante, para que se produzca difusión efectiva, las micelas deben encontrarse próximas a la superficie de absorción.

Por el contrario, si el sistema micelar presenta procesos de relajación y/o partición lentos, es probable que, gran cantidad de micelas alcancen la superficie activa de absorción actuando como reservorio del fármaco, favoreciendo la liberación del mismo y logrando actividad terapéutica sostenida en el tiempo (Pepić, Lovrić y Filipović-Grèić, 2012).

Se ha demostrado que *el tiempo de relajación micelar es más lento para tensioactivos no iónicos* respecto de iónicos. Esto presumiblemente se deba a la

ausencia de repulsión entre las cabezas polares de los surfactantes no iónicos (Jiao, 2008).

Asimismo, los agregados micelares constituidos por surfactantes no iónicos polioxietilénicos ofrecerían beneficios para la administración oftálmica:

COMPATIBILIDAD, ESCASA IRRITACIÓN/TOXICIDAD (Wang et al, 2017): la tensión interfacial que los polímeros no iónicos polioxietilénicos producen a la concentración en la que se forman los agregados es alta comparada con la de los tensioactivos iónicos. Esto hace que los surfactantes no iónicos resulten menos destructivos para las membranas celulares y por lo tanto menos tóxicos e irritantes (Pepić et al, 2012).

REDUCIDO TAMAÑO PARTICULAR

El reducido tamaño de estos agregados resulta ventajoso para la administración oftálmica al evitar molestias a nivel ocular. El tamaño particular, del sistema coloidal aplicado vía tópica, favorece la difusión a través de la barrera corneal habiéndose reportado permeación transcorneal para partículas de tamaño inferior a 100 nm (Nagarwal, 2009).

ESTABILIDAD TERMODINÁMICA Y CINÉTICA

Los agregados formados por surfactantes poliméricos tienen mayor estabilidad termodinámica que aquellos formados por surfactantes de menor peso molecular. Este aumento, está ligado a una reducción en los valores de CMC (1000 veces más bajos) para los agregados micelares poliméricos haciéndolos menos propensos a la desagregación a bajas concentraciones respecto de los surfactantes estándares.

Para la administración micelar tópica, la CMC constituye un factor crítico dado que reduce la posibilidad de pérdidas por dilución lagrimal o drenaje nasolagrimal (Mandal et al, 2017).

Asimismo, las micelas poliméricas también poseen estabilidad cinética en donde la disociación en monómeros es un proceso lento, incluso cuando el sistema está sujeto a condiciones de dilución extremas. Este efecto le permite a las micelas constituidas por polímeros no iónicos, conservar su integridad y retener el contenido de fármaco en el

área precorneal aumentando la posibilidad de alcanzar el sitio de acción (*Adams, Lavasanifar y Kwon, 2003*).

AUMENTO DE PERMEACIÓN TRNSCELULAR Y PARACELULAR

Los monómeros disociados de las micelas perturban las membranas plasmáticas resultando en un aumento de la tasa de permeación del fármaco. Asimismo, la flexibilidad de las micelas formadas sumado a la capacidad promotora de la permeación favorece la apertura de las uniones estrechas del epitelio corneal lo que induce el pasaje de la micela a través de los espacios para-celulares (*Jiao, 2008*).

ESTABILIDAD *IN VIVO*

Las micelas poliméricas mejoran la biodisponibilidad de los fármacos aumentando la estabilidad metabólica y el tiempo de circulación de los principios activos insolubles en agua. En particular, el núcleo hidrofóbico de la micela está estéricamente estabilizado exhibiendo menor probabilidad de opsonización por anticuerpos y una reducción de la captación por macrófagos del sistema reticuloendotelial. Esto da como resultado una mayor permanencia del fármaco a nivel sistémico.

Debido a la estabilidad cinética, las micelas poliméricas se disocian lentamente incluso a concentraciones inferiores a la CMC lo que prolonga el tiempo de circulación. Además, presentan núcleos más grandes en comparación con las micelas constituidas por tensioactivos no poliméricos. Esto conducirá a una mayor capacidad de solubilización.

Las micelas poliméricas pueden evadir las defensas naturales del organismo y liberar gradualmente el fármaco conduciéndolo específicamente hacia su sitio de acción (*Pathak, Vaidya y Pandey, 2019*).

PERMEACIÓN A TRAVÉS DE ENDOCITOSIS

Los agregados poliméricos posiblemente ingresen a las células mediante endocitosis (*Savic, 2003*).

VENTAJAS ASOCIADAS A LAS MICROEMULSIONES

- Son sistemas termodinámicamente estables (presentan excelente estabilidad a largo plazo)
- Claridad óptica, facilidad de preparación y fabricación a gran escala
- Baja viscosidad respecto de otras emulsiones por lo que pueden ser aplicadas para la vía parenteral.
- Mejora la eficacia del fármaco permitiendo reducir la dosis y por lo tanto minimizar efectos adversos. Aumenta la biodisponibilidad y disminuye la variabilidad entre pacientes.
- Pueden ser esterilizadas por filtración dado que el tamaño promedio es inferior a los 0,22 μm .
- La formación de la microemulsión es reversible. Pueden ser inestables a bajas o altas temperaturas, pero si se vuelve a temperaturas dentro del rango de estabilidad del sistema, la microemulsión se reconstituye.
- La existencia de micro-dominios de diferente polaridad en la misma solución de una única fase permite solubilizar materiales tanto hidrófilos como lipófilos y ambos en la misma formulación.
- Presentan una amplia variedad de aplicación como sistemas coloidales de liberación sitio dirigida y controlada.
- Facilidad de aplicación (*Lopes, 2014; Al- Achi, Gupta y Stagner, 2013; Win et al 2014*).

DESVENTAJAS ASOCIADAS AL EMPLEO DE LAS MICROEMULSIONES

“Estos sistemas presentarían la incertidumbre y desventajas generalmente asociadas a la nanotecnología terapéutica. Esta tecnología, como cualquier otra innovadora, presenta riesgos hasta ahora desconocidos” que podrían estar directamente relacionados al reducido tamaño de los sistemas y originarse como consecuencia de:

- a)** diferencias en el ingreso y tiempo de permanencia efectivo de estos sistemas en células y tejidos con respecto a los sistemas convencionales.
- b)** efectos transitorios y permanentes que los sistemas pudieran eventualmente causar sobre las funciones y el metabolismo celular.
- c)** diferencias en los mecanismos de eliminación desde tejidos y sangre (*Carlucci, 2009*).

Otras desventajas asociadas a las microemulsiones son:

- Se requieren grandes cantidades de surfactantes y co-surfactantes para estabilizar las nanogotas. Los cosolventes resultan costosos y pueden traer aparejado una amplia variedad de efectos adversos.
- Alto riesgo de efectos adversos tales como irritación.
- La estabilidad se ve afectada por factores externos como pH (por ej: fuerza iónica del tracto gastrointestinal) y temperatura (factores susceptibles de modificación tras la administración al paciente) (*Al-Achi, Gupta y Stagner, 2013*).

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

- Obtener sistemas nanométricos basados en componentes biocompatibles a fin de ser aplicados como productos farmacéuticos de uso tópico ocular destinados al tratamiento de glaucoma.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Confeccionar los Diagramas de Fase Pseudoternarios.
- Determinar mediante Dynamic Light Scattering el tamaño particular de las mezclas que constituyen el Diagrama de Fase.
- Analizar el/los sistemas creados por Microscopía Electrónica de Transmisión.
- Realizar estudios de estabilidad física de los sistemas seleccionados a fin de corroborar la estabilidad termodinámica de los sistemas diseñados.
- Determinar valores de pH de las diferentes fórmulas con el objeto de dilucidar la factibilidad de empleo del sistema a través de la vía tópica ocular.

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES

Surfactantes: Brij 35, Cremophor El, Tween 80 (Sigma Aldrich). Fase externa: Agua Bidestilada. Aceites: Aceite esencial de Citronella (Parafarm), Aceite esencial de Geranio (Just), Geraniol (Sigma Aldrich).

MÉTODOS

CONSTRUCCIÓN DEL DIAGRAMA DE FASES

Se construyeron los Diagramas de Fase Pseudoternarios correspondientes a la mezcla de Surfactantes (Cremophor EL, Tween 80, Brij 35)/Aceite (Citronella, Geranio, Geraniol) empleando el método de titulación con agua a 25 °C.

Los sistemas, que tras agitación moderada, se visualizaban como monofásicos presentando apariencia clara y transparente, se analizaron por Microscopía de Luz Polarizada y DLS.

Las muestras que, al ser observadas al microscopio, presentaron ausencia de birrefringencia se aislaron para efectuar la medición del tamaño de las nanogotas, graficándose en el diagrama sólo los puntos correspondientes a aquellas mezclas que arrojaron valores de tamaño particular inferior a los 100 nm. La región cubierta por estos puntos se denominó *Región de Microemulsión*. Los gráficos se obtuvieron haciendo uso del software *Origin Pro*.

PREPARACIÓN DE LAS FORMULACIONES

La mezcla de surfactantes Cremophor, Brij 35, Tween 80 (1:1:2) se calienta a 45 °C, con agitación moderada hasta lograr la fusión de las grageas de surfactante (Brij 35). Luego, se adiciona la fase oleosa siendo la relación Aceite - Cremophor El - Brij 35 - Tween 80 (1:1:1:2). Posteriormente, se añade la fase externa [Agua Bidestilada (Diagramas de Fase), Solución Fisiológica o Solución Fisiológica - Polietilenglicol 400 (PEG 400) 0,8% - Propilenglicol 0,6% (formula final, pruebas en animales)] a intervalos

de tiempo regulares y con agitación magnética moderada. Bajo estas condiciones, a temperatura ambiente se forman espontáneamente las microemulsiones.

ANÁLISIS DEL TAMAÑO DE LA FASE INTERNA

El tamaño medio de la gota de aceite (fase interna de la microemulsión) y el índice de poli-dispersión (PDI) se obtuvieron mediante DLS.

El instrumento utilizado es el nano ZEN 3690 modelo Zetasizer (Malvern, Reino Unido). Cada medición se llevó a cabo a temperatura ambiente por triplicado.

PH

El pH se midió a 25 °C utilizando Peachímetro Orion 710 A.

ESTABILIDAD TERMODINÁMICA DE LAS MUESTRAS SELECCIONADAS

Con el objeto de seleccionar sistemas estables y descartar aquellos metaestables o inestables, se han efectuado estudios de estabilidad sobre las microemulsiones formuladas.

La estabilidad física de los sistemas se monitoreó de modo continuo con el objeto de observar/detectar separación, turbidez a temperatura ambiente/refrigeración (4 °C).

TEST DE CENTRIFUGACIÓN

La fórmula se sometió a centrifugación a 3500 rpm por 30 min empleando una centrifuga ROTO SILENTA III.

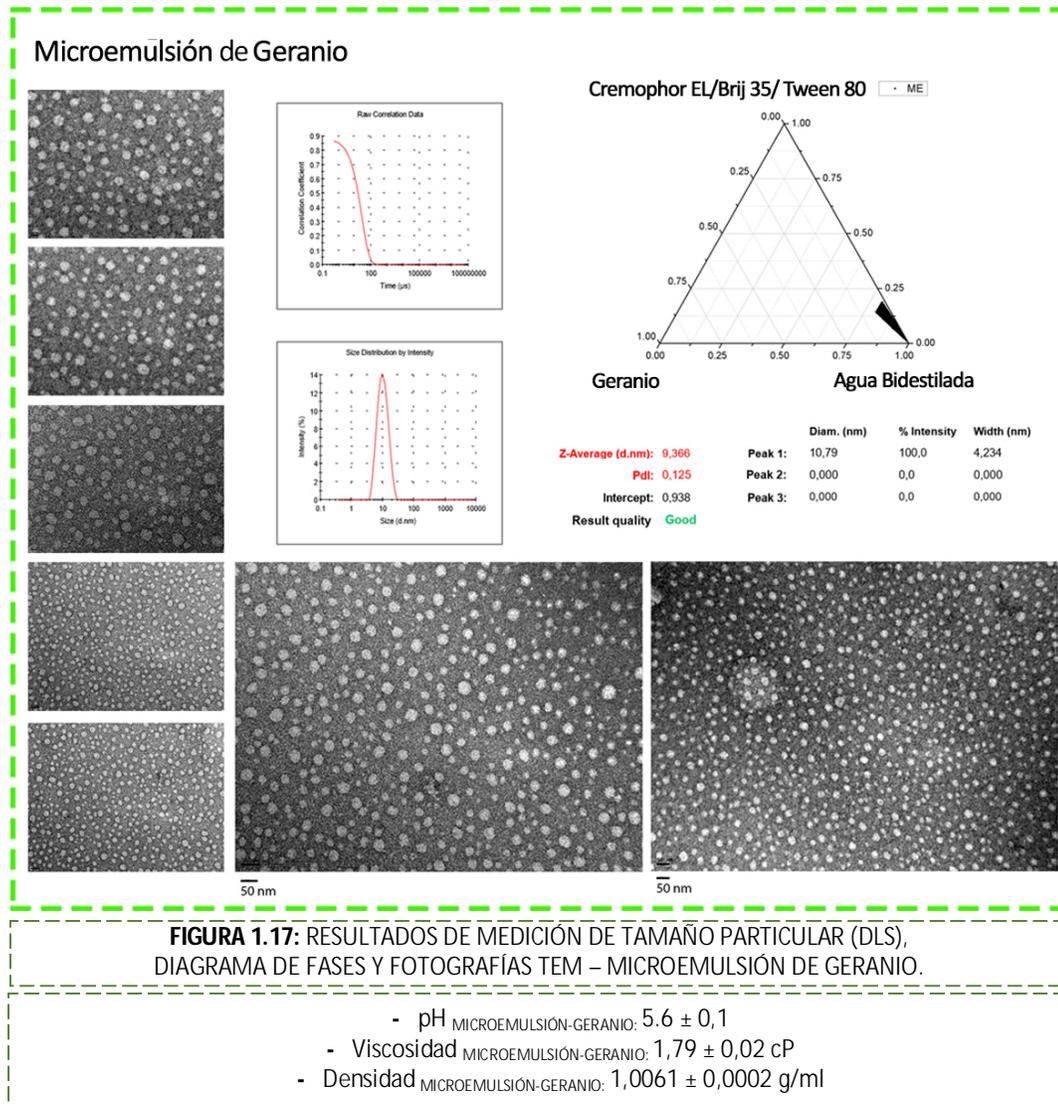
MEDICIÓN DE CONDUCTIVIDAD

Los cambios en la conductividad del sistema ante cantidades crecientes de agua se analizaron empleando un conductímetro OAKTON 510 series (Singapore).

El agua se añadió gota a gota a la mezcla de aceite y tensioactivos (con agitación magnética moderada). Las mediciones fueron siempre realizadas a 25 °C.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A continuación se detallan los resultados obtenidos para cada uno de los sistemas diseñados, habiendo sido analizadas 3 réplicas de cada una de las muestras.



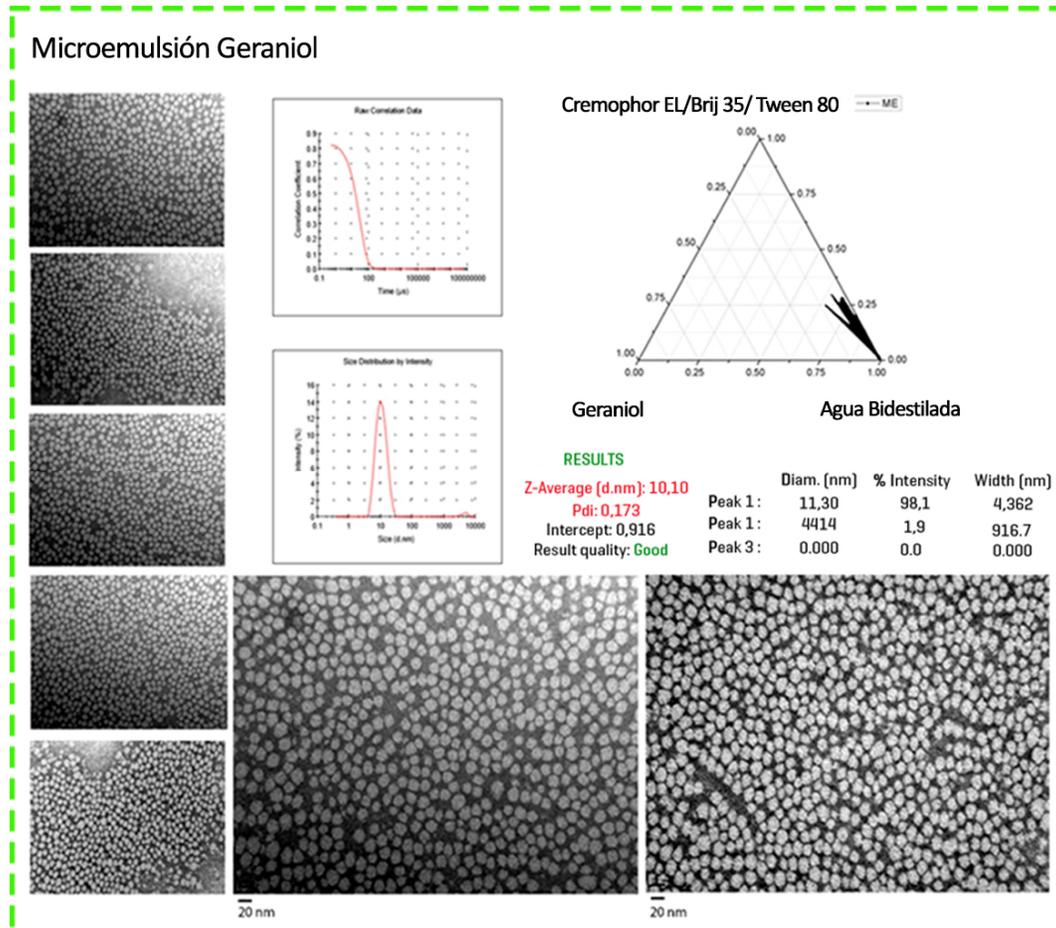
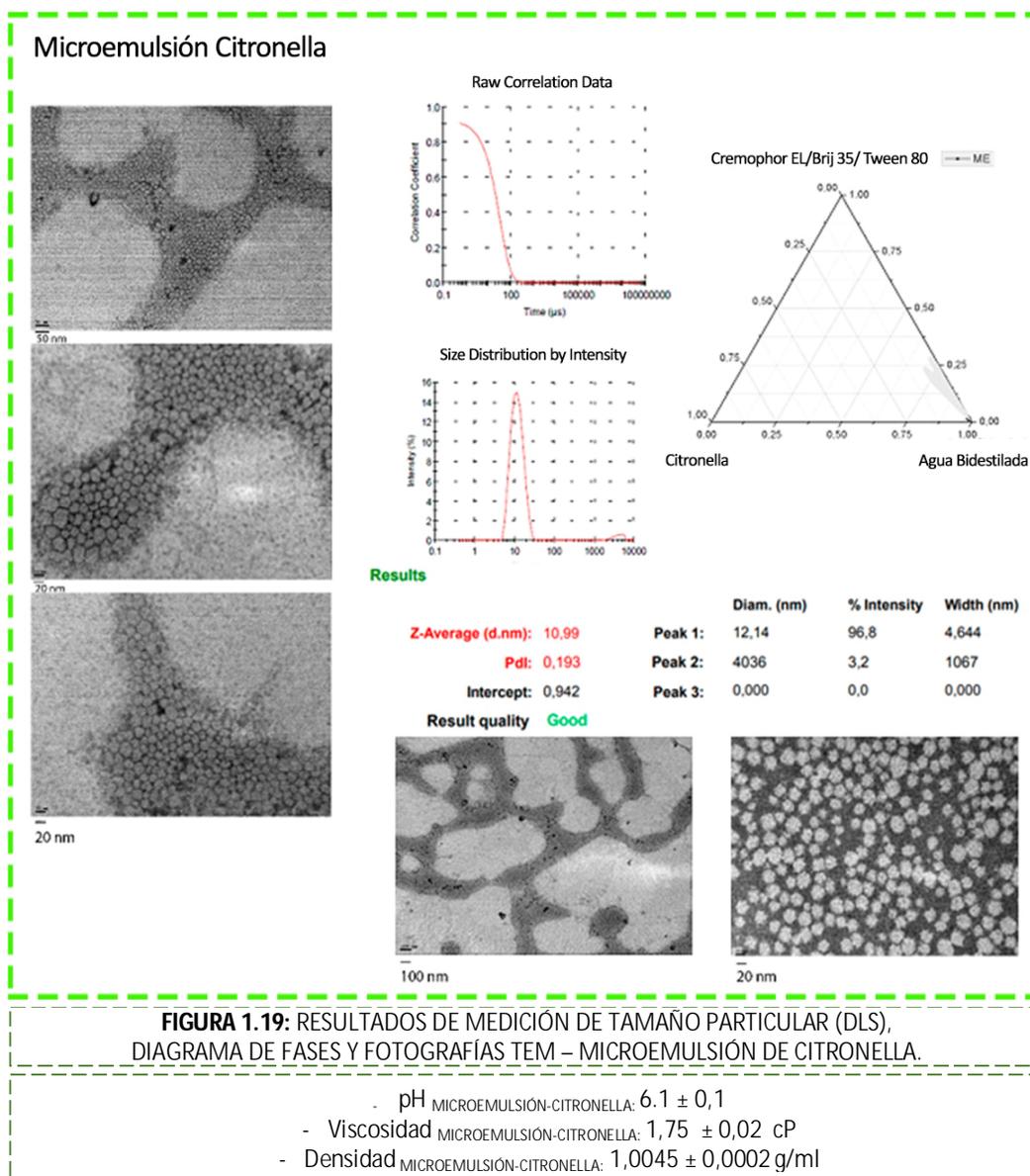


FIGURA 1.18: RESULTADOS DE MEDICIÓN DE TAMAÑO PARTICULAR (DLS), DIAGRAMA DE FASES Y FOTOGRAFÍAS TEM – MICROEMULSIÓN DE GERANIOL.

- pH MICROEMULSIÓN-GERANIOL: $5,5 \pm 0,1$
- Viscosidad MICROEMULSIÓN-GERANIOL: $1,77 \pm 0,02$ cP
- Densidad MICROEMULSIÓN-GERANIOL: $1,0058 \pm 0,0002$ g/ml



Como se puede apreciar en las Figuras 1.17, 1.18 y 1.19, se han obtenido 3 sistemas o/w constituidos por surfactantes no iónicos polioxietilénicos Brij 35, Tween 80 y Cremophor EL, aceites esenciales (citronella, geranio) y geraniol (componente individual presente en aceites esenciales) y agua bidestilada.

Los valores de tamaño obtenidos para estos sistemas oscilan entre 11 y 12 nm, con índices de polidispersión bajos, menores a 0,25, lo que asegura uniformidad de tamaño particular y estabilidad.

CONSTRUCCIÓN DE DIAGRAMAS DE FASE PSEUDOTERNARIO

Con el objeto de comprender aspectos asociados a la física del sistema, la preparación de las microemulsiones requirió la construcción de diagramas de fase para la determinación de la región de existencia de las mismas. En los Diagramas pueden visualizarse áreas correspondientes a mezclas monofásicas estables de tamaño particular inferior a los 100 nm, no habiendo sido objeto de estudio la evaluación de otro tipo de estructuras tales como emulsiones, cristales líquidos, geles, etc.

De los diversos sistemas diseñados, cabe destacar, que si bien las regiones de microemulsión obtenidas no fueron extremadamente extensas, permitieron manejar cierta flexibilidad al momento de seleccionar el rango de concentraciones de los componentes. De este modo, pudieron escogerse sistemas de reducido tamaño particular capaces de asegurar máxima permeación con la mínima concentración de surfactantes (9,5%) posible, a fin de lograr la obtención de fórmulas efectivas y al mismo tiempo no irritantes.

ESTUDIOS DE ESTABILIDAD

Los sistemas diseñados, véase Figuras 1.17, 1.18 y 1.19, se mantuvieron monofásicos y transparentes después de 6 meses de almacenamiento a 25°C y a 4°C, no observándose variaciones en el tamaño de las partículas, densidad, viscosidad y pH una vez transcurrido este período de tiempo, véase Tabla I.

TABLA I: MICROEMULSIONES DE CITRONELLA, GERANIO Y GERANIOL - COMPOSICIÓN, TAMAÑO PARTICULAR, VISCOSIDAD, pH (25°C - 4°C)						
MICROEMULSIONES	COMPOSICIÓN	ALMACENAMIENTO	TAMAÑO PARTICULAR (nm)	VISCOSIDAD (cP) (25°C)	pH (25°C)	DENSIDAD (g/ml) (25°C)
CITRONELLA	MEZCLA DE SURFACTANTES 9.5%, CITRONELLA 2.4%, AGUA 88.1%	ALMACENAMIENTO 25°C DESPUÉS DE 6 MESES	12,4 ± 4,5	1,76 ± 0,02	6,1 ± 0,1	1,0043 ± 0,0002
GERANIOL	MEZCLA DE SURFACTANTES 9.5%, GERANIOL 2.4%, AGUA 88.1%		11,6 ± 4,4	1,76 ± 0,02	5,4 ± 0,1	1,0057 ± 0,0002
GERANIO	MEZCLA DE SURFACTANTES 9.5%, GERANIO 2.4%, AGUA 88.1%		11,1 ± 4,3	1,78 ± 0,01	5,5 ± 0,1	1,0060 ± 0,0002
MICROEMULSIONES	COMPOSICIÓN	ALMACENAMIENTO	TAMAÑO PARTICULAR (nm)	VISCOSIDAD (cP) (25°C)	pH (25°C)	DENSIDAD (g/ml) (25°C)
CITRONELLA	MEZCLA DE SURFACTANTES 9.5%, CITRONELLA 2.4%, AGUA 88.1%	ALMACENAMIENTO A 4°C DESPUÉS DE 6 MESES	12,6 ± 4,2	1,76 ± 0,02	6 ± 0,1	1,0042 ± 0,0002
GERANIOL	MEZCLA DE SURFACTANTES 9.5%, GERANIOL 2.4%, AGUA 88.1%		11,5 ± 4,4	1,75 ± 0,02	5,4 ± 0,1	1,0058 ± 0,0002
GERANIO	MEZCLA DE SURFACTANTES 9.5%, GERANIO 2.4%, AGUA 88.1%		11,3 ± 4,3	1,78 ± 0,02	5,5 ± 0,1	1,0058 ± 0,0002

Además, los ejemplares fueron sometidos a centrifugación, previo y posterior al transcurso de los 6 meses, no habiéndose evidenciado fenómenos de separación de

fases al centrifugar durante 30 min a 3500 rpm lo que permitiría inferir que se trata de vehículos estables en un amplio rango de temperaturas.

También se evaluó el efecto por calentamiento a 45 °C durante 1 hora: bajo estas condiciones, los sistemas aumentaron la turbidez retomando el aspecto visual original al dejarlos reposar a temperatura ambiente.

Asimismo, tras 3 ciclos repetitivos de calentamiento a 50 °C durante 10 minutos con posterior enfriamiento a 25 °C, los sistemas adquirieron en principio, aspecto lechoso retomando la transparencia original al almacenarse a temperatura ambiente.

Referido a esto, cabe destacar, que la formación de microemulsiones es un proceso reversible. Estos sistemas suelen volverse inestables a elevadas o bajas temperaturas reestructurándose cuando las condiciones de exposición regresan al rango de estabilidad (*Santos et al, 2013*). Consecuentemente, el comportamiento anteriormente descrito constituye un indicador más del tipo de sistema coloidal obtenido.

Por otra parte, el fenómeno de aumento de turbidez con el incremento de temperatura puede deberse a que esta última variable constituye un factor determinante de la solubilidad acuosa de los surfactantes no iónicos (*Tadros, 2005*).

Resulta necesario mencionar que, la solubilidad en agua de la cadena de polióxido de etileno se debe a la formación de enlaces de hidrógeno entre el solvente y el átomo de oxígeno del éter de la cadena hidrocarbonada.

Estos enlaces, son sensibles a la temperatura por lo que para cada tensioactivo no iónico existe una temperatura a la que el grado de hidratación de la porción hidrófila es insuficiente para solubilizar la cadena hidrocarbonada restante. La temperatura a la cual ocurre la aparición de turbidez, se denomina Punto de Turbidez. A medida que aumenta la temperatura, se van desolvatando las cadenas polióxido de etileno y como consecuencia se reduce la hidrofilia del surfactante (*Myres, 2006*). Bajo estas condiciones, la CMC disminuye, el número de agregación crece y las micelas aumentan de tamaño hasta llegar a cierto valor (centenares de angstroms) en donde empiezan a interactuar con la luz, generando turbidez. Si se sigue incrementando la temperatura, las micelas alcanzan un tamaño suficiente (micrómetros) como para que la gravedad las pueda sedimentar, produciéndose separación de las fases (*Corti y Degiorgio, 1980*).

Algunas investigaciones demuestran que la formación de una red micelar conectada o las interacciones dependientes de la orientación entre las moléculas de agua y las

moléculas de surfactante podría ser responsable del comportamiento del punto de turbidez (*Bernheim-Groswasser et al, 2000; Zilman et al, 2004*).

La solubilidad en agua de las cadenas de polioxietileno aporta irregularidades a la superficie de la micela. Al incrementarse la temperatura, las moléculas de agua se vuelven más móviles la superficie se torna más regular, permitiendo la aproximación/unión de las unidades lo que daría lugar al fenómeno de turbidez y separación de fases (*Manohar, 2003*).

MICROSCOPÍA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN

Resulta necesario aclarar que si bien la microemulsión de Citronella se aprecia en imágenes como sistema bicontinuo, véase Figura 1.19, la microestructura obtenida para este sistema es del tipo o/w, habiéndose esto demostrado mediante estudios de conductividad.

CONDUCTIVIDAD

La medición de conductividad eléctrica es un método adecuado para determinar la nanoestructura de microemulsiones (*Lagourette et al, 1979*). La Figura 1.20 revela la conductividad del sistema, Citronella-Tween 80-Cremophor EL-Brij 35-Agua, en función de la relación de agua a lo largo de la línea de dilución obtenida tras la adición gradual de la fase externa.

Se puede observar que en principio, la conductividad es muy baja (cerca de cero) y aumenta lentamente con el incremento del contenido acuoso; es decir, a baja concentración de agua el sistema comienza a formar una microemulsión w/o con las pocas gotas de agua presentes en la fase oleosa, no resultando éstas suficientes como para lograr un intercambio de carga.

Cuando se alcanza el punto crítico (ϕ_p -umbral de percolación), la conductividad comienza a aumentar exponencialmente con el aumento de la fase acuosa.

Por debajo de ϕ_p , las gotas de agua comienzan a formar grupos aislados unos de otros por lo que presentan poca contribución a la conductividad eléctrica, obteniéndose valores bajos de conductancia.

En Φ_p , las gotas de agua se encuentran lo suficientemente cerca como para formar una red de canales conductores, lo que permite un flujo de carga sin obstáculos generándose el fenómeno de percolación y el consecuente aumento abrupto de la conductividad. Conforme al concepto de percolación, las propiedades eléctricas resultantes de las interacciones atractivas entre las gotas de agua caracterizan a las estructuras bicontinuas (Bhattacharya et al, 1985; Lagourette et al, 1979; Thevenin, Grossior y Poelmann, 1996; Wang et al, 2015; Eicke, Borkovec y Das Gupta, 1989).

Posteriormente, la disminución observada en la conductividad se debe a los efectos de dilución (Wang et al, 2017).

El valor de conductividad máximo obtenido para la microemulsión de citronella, fue alcanzado con un 76% de fase acuosa lo que permite concluir que, al porcentaje de agua correspondiente al contenido de la fórmula (88,10%), el sistema obtenido es de tipo o/w. Asimismo, según lo reportado en la bibliografía, debido a la naturaleza frágil de las microemulsiones, la caracterización por TEM suele presentar serios inconvenientes. A menudo, la preparación de la muestra genera modificaciones en la microestructura del sistema pudiendo incluso producirse separación de fases (Grassi et al, 2007). Esto podría justificar las discrepancias entre la microestructura evidenciada en las imágenes obtenidas por TEM y la determinada por Conductividad.

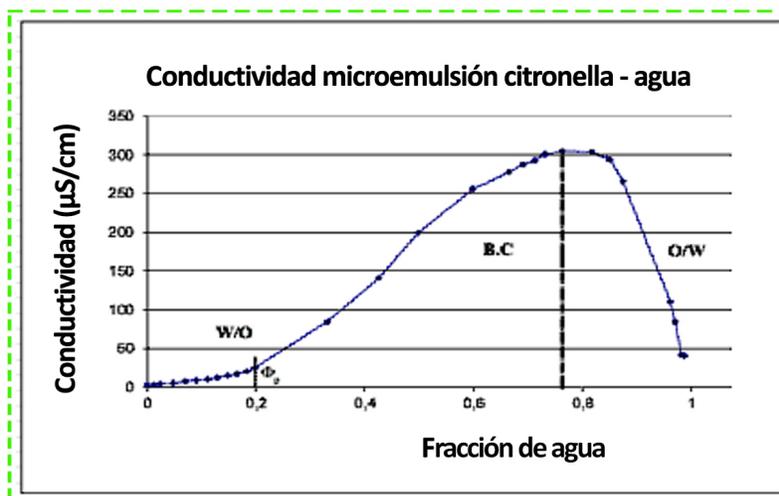


FIGURA 1.20: CONDUCTIVIDAD DE LA MEZCLA CITRONELLA: BRIJ 35: CREMOPHOR EL: TWEEN 80 (1:1:1:2) EN FUNCIÓN DE LA FRACCIÓN DE AGUA AÑADIDA AL SISTEMA.
W/O= MICROEMULSIÓN AGUA/ACEITE; O/W=MICROEMULSIÓN ACEITE/AGUA; B.C= MICROEMULSIÓN BICONTINUA.

MEDICIÓN DE pH

Los valores de pH obtenidos varían desde 5,4 hasta 6,1, véase Figuras 1.17, 1.18 y 1.19. Estos valores son tolerados en ojo (véase Capítulo II) lo que posibilitaría una aplicación tópica ocular.

MEDICIÓN DE VISCOSIDAD

Los resultados de viscosidad (véase Figuras 1.17, 1.18 y 1.19) también se adaptaron a lo sugerido para la vía de administración ocular, véase Capítulo II.

CONCLUSIÓN

Para la elaboración de las fórmulas se emplearon surfactantes no iónicos polioxietilénicos que ofrecerían potenciales beneficios a nivel oftálmico, tales como: alto grado de compatibilidad biológica, escasa irritación/toxicidad ocular, estabilidad termodinámica y cinética, potencial efecto para la liberación sostenida de fármacos así como aumento de la permeación (transcelular y paracelular) en córnea.

Las fórmulas diseñadas han demostrado elevada estabilidad termodinámica por lo que pueden obtenerse con facilidad sin necesidad de aporte energético ni empleo de instrumental sofisticado, siendo altamente factible la producción a gran escala.

Asimismo, los procedimientos de obtención (simple mezcla y agitación de los componentes), esterilización (filtración) así como el elevado porcentaje de agua en las formulas (88,10%) y el reducido costo del resto de los constituyentes, determinan un alto grado de viabilidad desde el punto de vista económico.

En lo que respecta a la aplicación oftálmica, las microemulsiones de tipo aceite en agua (o/w) diseñadas al presentar un tamaño particular inferior a los 100 nm (11-12 nm) favorecerían el acceso de los fármacos a sitios más profundos de la estructura ocular, no alcanzados por fórmulas tópicas de uso convencional.

Además, según lo observado en los diagramas de fase, los sistemas toleran la adición de gran cantidad de agua por lo que, tras la instilación, es probable sobrelleven bien el efecto de dilución en el film lagrimal. De este modo, el sistema podría conservar su integridad en el área pre ocular lo que aseguraría elevada disponibilidad para la efectiva permeación en córnea.

Por otra parte, los parámetros fisicoquímicos evaluados en la totalidad de los sistemas (tamaño particular, pH, viscosidad) resultaron apropiados para la vía de administración pretendida. Consecuentemente, las fórmulas quedaron sujetas a estudios exhaustivos basados en ensayos en animales de experimentación (ensayos de irritación y de evaluación de la efectividad terapéutica) con el objeto de determinar la seguridad de las formulaciones y seleccionar sistemas afines/compatibles con la vía de administración ocular.

BIBLIOGRAFÍA

- Adams, M. L., Lavasanifar, A y Kwon, G. S. (2003). Amphiphilic block copolymers for drug delivery. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 92(7), pp: 1343-1355.
- Al-Achi, A., Gupta, M. R y Stagner, W. C. (2013). Dispersed System Product Design. En: *Integrated Pharmaceutics: Applied Preformulation, Product Design and Regulatory Science*, pp: 359-413. John Wiley & Sons, Inc, USA.
- Alany, R. G., El Maghraby, G. M. M., Krauel Goellner, K y Graf, A. (2009). Microemulsions systems and their potential as drug carriers. En: Fanun, M (ed). *Microemulsions properties and applications*, pp: 248-291. CRC Press, USA.
- Alany, R. G y Wen, J. (2008). Microemulsions as Drug Delivery Systems. En: Gad, S. C. (Ed). *Pharmaceutical manufacturing handbook: production and processes*, pp: 769-792. John Wiley & Sons, Inc., New Jersey.
- Attwood, D y Florence, A. T. (2008). Emulsions, suspensions and other dispersed systems. En: *Physical Pharmacy*, pp: 63-79. Pharmaceutical Press, UK.
- Bagwe, R. P., Kanicky, J. R., Palla, B. J., Patanjali, P. K y Shah, D. O. (2001). Improved drug delivery using microemulsions: rationale, recent progress, and new horizons. *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 18(1), pp: 77-140.
- Bernheim-Groswasser, A., Wachtel, E y Talmon, Y. (2000). Micellar Growth, Network Formation, and Criticality in Aqueous Solutions of the Nonionic Surfactant C12E5. *Langmuir*, 16(9), pp: 4131-4140.
- Bhattacharya, S., Stokes, J. P., Kim, M. W y Huang, J. S. (1985). Percolation in an Oil-Continuous Microemulsion. *Physical Review Letters*, 55(18), pp: 1884-1887.
- Carlucci, A. M y Bregni, C. (2009). Productos Nanotecnológicos de Aplicación en Farmacoterapia. *Latin American Journal of Pharmacy*, 28(3), pp: 470-477.
- Constantinides, P. P. (1995). Lipid Microemulsions for Improving Drug Dissolution and Oral Absorption: Physical and Biopharmaceuticals Aspects. *Pharmaceutical Research*, 12 (11), pp: 1561-1572.
- Corti, M y Degiorgio, V. (1980). Critical Behavior of a Micellar Solution. *Physical Review Letters*, 45(13), pp: 1045-1048.
- Delgado Charro, M. B., Otero Espinar, F. J y Blanco Méndez, J. (2001). Sistemas Heterogéneos. En: Vila Jato, J. L (ed). *Tecnología farmacéutica-Volumen I: Aspectos fundamentales de los sistemas farmacéuticos y operaciones básicas*, pp: 207-316. Síntesis S. A, España.

Dickinson, E. (1989). Food Colloids- an overview. *Colloids and Surfaces*, 42(1), pp: 191-204.

Dickinson, E. (1998). Stability of rheological implications of electrostatic milk protein-polysaccharide interactions. *Trends in Food Science and Technology*, 9(10), pp: 347-354.

Du, X., Lucia, L. A y Ghiladi, R. A. (2016). A Novel Approach for Rapid Preparation of Monophasic Microemulsions That Facilitates Penetration of Woody Biomass. *American Chemical Society Sustainable Chemistry & Engineering*, 4(3), pp: 1665-1672.

Eicke, H. F., Borkovec, M y Das Gupta, B. (1989). Conductivity of water in oil microemulsions a quantitative charge fluctuation model. *Journal of Physical Chemistry*, 93, pp: 314-317.

FDA. (2001). *Food and Drug Administration*, Washington, DC.

Fletcher, P. D. I y Morris, J. S. (1995). Turbidity of oil-in-water microemulsion droplets stabilised by nonionic surfactants. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 98(1-2), pp: 147-154.

Ghosh P. K y Murthy, R. S. R (2006). Microemulsions A potential drug delivery system. *Current Drug Delivery*, 3(2), pp: 167-180.

Grassi, M., Grassi, R., Lapasin, R y Colombo, I. (eds) (2007). Drug release from microemulsions. En: *Understanding Drug Release and Absorption Mechanisms*, pp: 493-538. CRC Press Taylor & Francis Group, USA.

He, C. X., He, Z. G y Gao, J. Q. (2010). Microemulsions as drug delivery systems to improve the solubility and the bioavailability of poorly water-soluble drugs. *Expert Opinion on Drug Delivery*, 7(4), pp: 445-460.

Huang, L. F., Dong, J y Karki, S. B. (2018). Formulation Strategies And Practice Used For Drug Candidates With Water Insoluble Properties For Toxicology, Biology And Pharmacology Studies In Discovery Support. En: Liu, R (ed). *Water Insoluble Drug Formulation*, pp: 125-149. CRC Press - Taylor Francis Group, USA.

Jain, G. K., Ahmad, F. J y Khar, R. K. (eds). (2012). Pharmaceutical emulsions. En: *Theory and Practice of Physical Pharmacy*, pp: 223-248, Elsevier, India.

Jiao, J. (2008). Polyoxyethylated nonionic surfactants and their applications in topical ocular drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 60(15), pp: 1663-1673.

Juškaitė, V., Ramanauskienė, K y Briedis, V. (2015). Design and Formulation of Optimized Microemulsions for Dermal Delivery of Resveratrol. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2(45), pp: 1-10.

Kahlweit, M., Strey, R., Haase, D., Kunieda, H., Schmeling, T., Faulhaber, B., ... Jahn, W. (1987). How to study microemulsions. *Journal of Colloid And Interface Science*, 118(2), pp: 436-453.

Kaler, E. W., Davis, H. T y Scriven, L. E. (1983). Toward understanding microemulsion microstructure. *The Journal of Chemical Physics*, 79(11), pp: 5685-5692.

Kunied, H., Hasegawa, Y., John, A. C., Naito, M y Muto, M. (1996). Phase behaviour of polyoxyethylene hydrogenated castor oil in oil/water system. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 109, pp: 209-216.

Lagourette, B., Peyrelasse, J., Boned, C y Clause, M. (1979). Percolative conduction in microemulsion type systems. *Nature*, 281(5726), pp: 60-62.

Lawrence, M. J y Rees, G. D. (2000). Microemulsion-based media as novel drug delivery systems. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 45(1), pp: 89-121.

Lima, M. P. D., Lopes, E. M., Gomes, L. da S., França, A. R. de S., Acha, B. T., Carvalho, A. L. M y Almeida, F. R. (2018). Technological development of microemulsions with perspectives for pain treatment: a patent review. *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, pp: 691-702.

Lopes, L. B. (2014). Overcoming the Cutaneous Barrier with Microemulsions. *Pharmaceutics*, 6(1), pp: 52-77.

Lu, G. W y Gao, P. (2010). Emulsions and microemulsions for topical and transdermal Delivery. En: Kulkarni, V. S (ed). *Handbook of Non Invasive Delivery Systems*, pp: 59-94. William Andrew, Elsevier, USA.

Lu, Y y Park, K. (2013). Polymeric micelles and alternative nanonized delivery vehicles for poorly soluble drugs. *International Journal of Pharmaceutics*, 453(1), pp: 198-214.

Lu, Y., Zhang, E., Yang, J y Cao, Z. (2018). Strategies to improve micelle stability for drug delivery. *Nano Research*, 11(10), pp: 4985-4998.

Malcolmson, C., Satra, C., Kantaria, S., Sidhu, A y Lawrence, M. J. (1998). Effect of oil on the level of solubilization of testosterone propionate into non-ionic oil-in-water microsmulsions. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 87(1), pp: 109-116.

Malmsten, M. (ed) (2002). Introduction. En: *Surfactants and Polymers in Drug Delivery*, pp: 01-17. Marcel Dekker, Inc, USA.

Mandal, A., Bisht, R., Rupenthal, I. D y Mitra, A. K. (2017). Polymeric micelles for ocular drug delivery: From structural frameworks to recent preclinical studies. *Journal of Controlled Release*, 248, pp: 96-116.

Manoharan, C., Basarkar, A y Singh, J. (2010). Various Pharmaceutical Disperse Systems. En: Kulshreshtha, A. K (ed). *Pharmaceutical Suspensions: from formulations Development to Manufacturing*, pp: 1-37. Elsevier, UK.

Manohar, C. (2003). Mechanism of the Clouding Phenomenon in Surfactant Solutions. En: Mittal, K. L y Shah, D. O (eds). Adsorption and aggregation of surfactants in solution, pp: 211-217. Marcell Dekker, Inc, USA.

Mc Clements, D. J. (2012). Nanoemulsions versus microemulsions: Terminology, differences, and similarities. *Soft Matter*, 8(6), pp: 1719-1729.

Mehta, S. K y Kaur, G. (2011). Microemulsions: Thermodynamic and Dynamic Properties. Thermodynamics. En: Tadashi, M (ed). *Thermodynamics*, pp: 381-406. InTech Europe, Croacia.

Misra, A., Florence, K., Lalan, M y Shah, T. (2011). Microemulsions in Biotechnology and Pharmacy : An Overview. En: Fanun, M (ed). *Colloids in Biotechnology*, pp: 381-415. CRC Press, USA.

Myres, D. (2006) (ed). The Organic Chemistry of Surfactants. En: *Surfactant Science and Technology*, pp: 29-79. John Willey and Sons, Inc, USA.

Nagarajan, R y Ruckenstein, E. (2000). Molecular Theory of Microemulsions. *Langmuir*, 16(16), pp: 6400-6415.

Nagarwal, R. C., Kant, S., Singh, P. N., Maiti, P y Pandit, J. K. (2009). Polymeric nanoparticulate system: A potential approach for ocular drug delivery. *Journal of Controlled Release*, 136(1), pp: 2-13.

Narang, A., Delmarre, D y Gao, D. (2007). Stable drug encapsulation in micelles and microemulsions. *International Journal of Pharmaceutics*, 345(1-2), pp: 9-25.

Nornoo, A. O y Chow, D. S. L. (2008). Cremophor-free intravenous microemulsions for paclitaxel. Stability, in vitro release and pharmacokinetics. *International Journal of Pharmaceutics*, 349(1-2), pp: 117-123.

Patel, M. R., Patel, R. B., Parikh, J. R., Solanki, A. B y Patel, B. G. (2009). Effect of Formulation Components on the In Vitro Permeation of Microemulsion Drug Delivery System of Fluconazole. *American Association of Pharmaceutical Science Pharmaceutical Science and Technology*, 10(3), pp: 917-923.

Pathak, C., Vaidya, F. U y Pandey, S. M. (2019). Mechanism for Development of Nanobased Drug Delivery System. En: Shyam, S. M., Ranjan, S., Dasgupta, N., Mishra, R.

- K y Thomas, S (eds). *Applications of Targeted Nano Drugs and Delivery Systems*, pp: 35-67. Elsevier, UK.
- Peng, C. C., Bengani, L. C., Jung, H. J., Leclerc, J., Gupta, C y Chauhan, A. (2011). Emulsions and microemulsions for ocular drug delivery. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 21(1), pp: 111-121.
- Pepić, I., Lovrić, J y Filipović-Grèić, J. (2012). Polymeric Micelles in Ocular Drug Delivery: Rationale, Strategies and Challenges. *Chemical and Biochemistry Engineering Quarterly*, 26(4), pp: 365-377.
- Porter, M. R (ed). (1991). General Introduction. En: *Handbook of Surfactants*, pp: 01-05. Springer Science + Business Media, LLC, USA.
- Porter, M. R (ed). (1991). Use of Surfactant Theory. En: *Handbook of Surfactants*, pp: 24-47. Springer Science + Business Media, LLC, USA.
- Rao, J y Mc Clements, D. J. (2011). Formation of Flavor Oil Microemulsions, Nanoemulsions and Emulsions: Influence of Composition and Preparation Method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(9), pp: 5026-5035.
- Rosano, H. L., Cavello, J. L y Lyons, G. B. (1987). Mechanism of formation of six microemulsion systems. En: Rosano, M. L y Clausse, M. (eds). *Microemulsion systems*, pp: 259-275. Marcel Dekker, Inc., USA.
- Rosen M. J. (ed). (2004). Adsorption of surface-active agents at interfaces: the electrical double layer. En: *Surfactants and Interfacial Phenomena*, pp: 34-104. John Wiley & Sons, Inc, USA.
- Ruckenstein, E. C. J. (1993). Stability of microemulsions. *Journal of Chemical Society, Faraday Transactions II*, 2(71), pp: 1690-1706.
- Saidi, Z., Mathew, C., Peyrelasse, J y Boned, C. (1990). Percolation and critical exponents for the viscosity of microemulsions. *Physical Review A*, 42(2), pp: 872-876.
- Santos, S. dos, Medronho, B., Santos, T. dos y Antunes, F. E. (2013). Amphiphilic molecules in Drug Delivery. En: Coelho, J. (Ed). *Advances in Predictive, Preventive and Personalised Medicine Drug Delivery Systems: Advanced Technologies Potentially Applicable in Personalised Treatment*, pp: 35-85. Springer, USA.
- Savic, R. (2003). Micellar Nanocontainers Distribute to Defined Cytoplasmic Organelles. *Science*, 300(5619), pp: 615-618.
- Shah, D y Hamlin, R. (1971). Structure of Water in Microemulsions: Electrical, Birefringence, and NMR studies. *Science*, 171(3970), pp: 483-485.

Shakeel, F., Baboota, S., Ahuja, A., Ali, J., Aqil, M y Shafiq, S. (2007). Nanoemulsions as Vehicles For Transdermal Delivery Of Aceclofenac. *American Association of Pharmaceutical Scientists Pharmaceutical Science and Technology*, 8(4), pp: E1-E9.

Shinoda, K y Kuneida, H. (1973). Conditions to produce so called microemulsions: Factors to increase mutual solubility of oil and water by solubilizer. *Journal of Colloid and Interface Science*, 42(2), pp: 381-387.

Shinoda, K y Lindman, B. (1987). Self organizing structures of lecithin, organized surfactant systems: Microemulsions. *Langmuir*, 3(2), pp: 135-149.

Simonazzi, A., Cid, A. G., Villegas, M., Romero A., Palma S. D y Bermudez, J. (2018) Nanotechnology application in Drug Controlled Release. En: Alexandru Grumezesciu (ed). *Drug Targeting and stimuli sensitive drug delivery systems*, pp: 81-116. San Diego William Andrew - Elsevier, USA.

Sinko, P. J y Singh, Y (eds). (2011). Colloidal Dispersions. En: *Martin´s physical pharmacy an pharmaceutical sciences*, pp: 386-409. Wolter Kluwer/Lippincott Williams and Wilkins, USA.

Sinko, P. J y Singh, Y (eds). (2011). Colloidal Dispersions. En: *Martin´s physical pharmacy an pharmaceutical sciences*, pp: 410-441. Wolter Kluwer/Lippincott Williams and Wilkins, USA.

Soberón-Chávez, G y Raina, M. M (eds). (2011). *Biosurfactants: a general overview*. En: *Biosurfactants from genes to Applications*, pp: 01-11. Microbiology Monographs. Springer-Verlag Berlin, Alemania.

Tadros, T. F. (2005). Microemulsions. En: *Applied Surfactants: Principles and Applications*, pp: 309-333. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, UK.

Tadros, T. F (ed). (2005). Introduction. En: *Applied Surfactants: Principles and Applications*, pp: 01-18. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, UK.

Tadros, T. F (ed) (2005). Surfactants in pharmaceutical formulations. En: *Applied Surfactants: Principles and Applications*, pp: 433-501. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, UK.

Tadros, T. F (ed). (2014). General Introduction. En: *An introduction to surfactants*, pp: 01-04. Walter de Gruyter GmbH, Alemania.

Tekade, R. K y Tekade, M. (2016). Ocular Bioadhesives and their applications in Ophthalmic Drug Delivery. En: Pathak, Y., Sutariya, V e Hiramani, A. A. (eds). *Nano-biomaterials for ophthalmic drug delivery*, pp: 211-230. Springer International Publishing, Suiza.

Tenjarla, S. (1999). Microemulsions: an overview and pharmaceutical applications. *Critical Review Therapeutic Drug Carrier System*, 16(5), pp: 461-521.

Thevenin M. A, Grossiord J. L y Poelman M. C. (1996). Sucrose esters/cosurfactant microemulsion systems for transdermal delivery: Assessment of bicontinuous structures. *International Journal of Pharmaceutics*, 137(2), pp: 177-186.

Wang, X. Q y Zhang, Q. (2013). Microemulsions for Drug Solubilization and Delivery. En: Douroumis, D y Fahr, A (eds). *Drug Delivery Strategies for Poorly Water-Soluble Drugs*, pp: 287-323. John Wiley & Sons, Ltd, UK.

Wang, W., Wei, H., Du, Z., Tai, X y Wang, G. (2015). Formation and characterization of fully dilutable microemulsion with fatty acid methyl esters as oil phase. *American Chemical Society Sustainable Chemistry Engineering*, 3(3), pp: 443-450.

Wang, C., Tai, X., Du, Z y Liu, X. (2017). Formulation and physicochemical properties of promising avermectin microemulsion with biodegradable surfactant and oil. *Journal of Dispersion Science and Technology*, 38(3), pp: 409-415.

Win, M., Lang, P., Vashishtha, M y Shah, D. O. (2014). Pharmaceutical Microemulsions and Drug Delivery. En: Romsted, L. S (ed). *Surfactant Science and Technology: Retrospects and Prospects*, pp: 377-397. CRC Press, USA.

Zana, R (ed). (2005). Surfactants and self assemblies of surfactants. En: *Dynamic of surfactants and self assemblies: micelles, microemulsions, vesicles and lyotropic phases*, pp: 2-35. CRC Press, USA.

Zheng, Y., Zheng, M., Ma, Z., Xin, B., Guo, R y Xu, X. (2015). Sugar Fatty Acid Esters. En: Ahmad, M. U., Xu, X (eds). *Polar Lipids: Biology, Chemistry and Technology*, pp: 215-243. AOCS Press/Academic Press, USA.

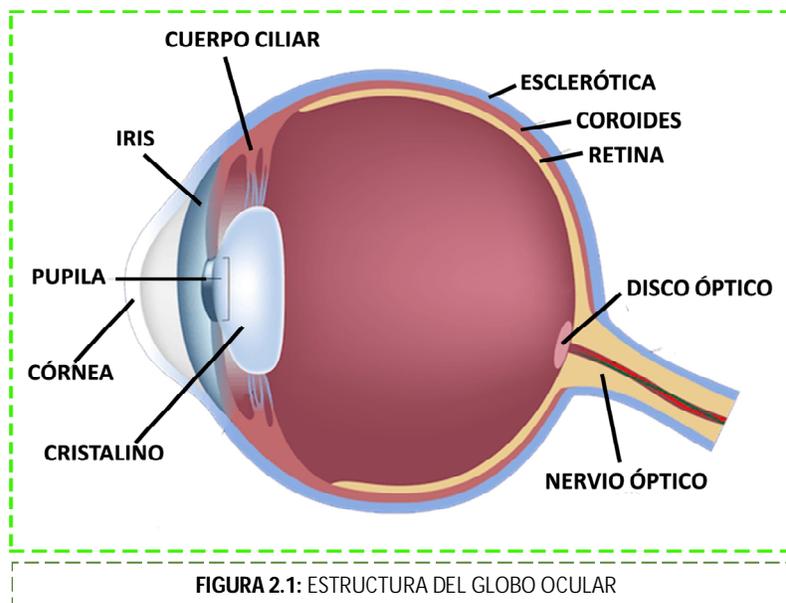
Zilman, A., Safran, S. A., Sottmann, T y Strey, R. (2004). Temperature Dependence of the Thermodynamics and Kinetics of Micellar Solutions. *Langmuir*, 20(6), pp: 2199-2207.

CAPÍTULO II: MICROEMULSIONES COMO VEHÍCULOS PORTADORES DE FÁRMACOS OCULARES.

INTRODUCCIÓN

Para comprender ciertos aspectos relacionados con enfermedades oculares e interpretar el comportamiento de las formas farmacéuticas destinadas al tratamiento de estas afecciones, resulta necesario describir conceptos básicos asociados a la estructura anatómica del ojo y su funcionamiento.

ESTRUCTURA DEL OJO: GENERALIDADES



El ojo es el órgano sensorial encargado de recibir los estímulos luminosos externos, codificarlos y enviarlos a través del nervio óptico a los centros de la visión en la región occipital del cerebro para que se produzca el fenómeno de la visión.

El globo ocular está formado por tres túnicas o capas concéntricas: túnica externa, media o vascular e interna.

La túnica externa o capa fibrosa está compuesta por una parte posterior y opaca, la esclerótica y por una parte anterior transparente, la córnea (Cholkar et al, 2013; Shahidullah, Al-Malki y Delamere, 2011), véase Figura 2.1.

La esclerótica y la córnea son las capas más duras y externas del ojo, las cuales resisten la presión interna normal (13-19 mmHg). Esta presión intraocular (PIO) da al ojo su forma manteniendo las dimensiones necesarias para obtener la visión aguda.

La esclerótica cubre las cinco sextas partes de la superficie del ojo y la córnea el sexto restante. Aunque las fibras de colágeno tipo I constituyen el elemento principal de ambos tejidos, las diferencias en el tamaño y orientación, el grado de hidratación y la presencia de mucopolisacáridos determinan variaciones asociadas a la transparencia (córnea) y opacidad (esclerótica) características de los tejidos (*Wilson et al, 2007*).

La cornea es avascular y recibe nutrientes de la película lagrimal, el humor acuoso y los vasos del limbo. En contraste, la esclerótica al ser vascularizada recibe aporte nutricional de una amplia variedad de vasos sanguíneos presentes en las capas superiores (epiesclera) (*Cholkar et al, 2013*).

La **capa intermedia o úvea** comprende el iris en la parte anterior, la coroides en la parte posterior y el cuerpo ciliar como parte intermedia, véase Figura 2.1.

Inmediatamente por debajo de la esclerótica, existen vasos que se ramifican progresivamente formando una intrincada red de arteriolas, capilares y venas, encargada del aporte sanguíneo al globo ocular. Más adelante, la red vascular adquiere una porción muscular lisa conocida como el músculo ciliar, de apariencia rugosa en su superficie interna debido a la presencia de los procesos ciliares. Todo este conjunto se conoce como **cuerpo ciliar** y su función es regular el proceso de acomodación del cristalino (a través del músculo ciliar) y la producción de humor acuoso en los procesos ciliares.

El humor acuoso es secretado activamente en los procesos ciliares hacia la cámara posterior, pasa por la pupila hasta la cámara anterior y abandona el ojo por el canal de Schlemm, ubicado en el ángulo camerular (Liebovitch, 2006; Rogers, 2011).

Normalmente la cantidad de humor acuoso que se produce es igual a la cantidad que se elimina por el ángulo camerular, de tal manera que el volumen neto de líquido se mantiene constante y la presión intraocular (PIO) se encuentre dentro de límites normales (hasta 18 mmHg aproximadamente) (*Liebovitch, 2006*).

La **capa interna** o retina (véase Figura 2.1) representa una extensión del sistema nervioso central, presenta neuronas originadas en el cerebro, sensibles a la luz y responsables de transmitir señales al cerebro para lograr el fenómeno de la visión (*Mitra, Anand y Duvvuri, 2006*).

Asimismo, el globo ocular puede dividirse en dos segmentos: un segmento anterior que consiste en la córnea, la conjuntiva, el cuerpo ciliar, el iris, humor acuoso, cristalino

y un segmento posterior (retina, el humor vítreo, coroides y esclerótica) (*Cholkar et al, 2013*).

VÍAS DE ADMINISTRACIÓN OCULAR

Las enfermedades oculares se tratan principalmente mediante administración tópica.

La mayoría de las patologías que se presentan a nivel ocular se resuelven a través de la aplicación de soluciones administradas en forma de gotas oftálmicas (si el fármaco es hidrosoluble) o ungüentos (si el principio activo es hidrofóbico, no soluble en agua) (*Sheardown y Saltzman, 2006*).

La aplicación tópica constituye la vía de elección preferida debido a la facilidad de administración, bajo costo y alto nivel de aceptación por parte del paciente (*Le Bourlais et al, 1998*). No obstante, tras la instilación de la gota solo un 5% de la dosis administrada alcanza el humor acuoso. En consecuencia, resulta necesario aumentar la frecuencia de aplicación lo que genera inconvenientes y discomfort (*Gaudana et al, 2008*).

Asimismo, la vía tópica resulta ineficiente para administrar concentraciones terapéuticas de un fármaco en el segmento posterior, debido a: la rápida pérdida a través de los conductos nasolagrimales, la reducida permeabilidad del epitelio corneal, la absorción sistémica y demás barreras fisiológicas y anatómicas presentes en el globo ocular.

La administración sistémica de medicamentos constituye una alternativa no invasiva, generalmente aceptada por el paciente. No obstante, el suministro de fármacos a través de esta vía no resulta efectivo debido a la alta eficiencia de la barrera hemato ocular (término que se refiere a las uniones estrechas presentes en el epitelio no pigmentado del cuerpo ciliar, en el tejido del iris y en sus vasos sanguíneos) y a la barrera hemato-retiniana (constituida por una membrana externa - epitelio pigmentado de la retina y membrana interna formada por las células endoteliales que rodea a la microvasculatura retinal). Estas barreras promueven la necesidad de suministro de altas dosis para lograr un efecto terapéutico en los tejidos oculares del segmento posterior, lo que genera la aparición de una gran variedad de efectos adversos (*Hughes et al, 2005; Yadav, Verma e Yadav, 2018*).

Por lo anteriormente expuesto, debido a la complejidad de la anatomía ocular y barreras hemato-oculares, las inyecciones intraoculares han avanzado como métodos comunes para la administración de fármacos de uso oftálmico.

La administración intracameral (inyección directa de la solución del fármaco en la cámara anterior) generalmente se utiliza después de la cirugía de cataratas y para el tratamiento de enfermedades del segmento anterior, como la queratitis fúngica y bacteriana. Sin embargo, este método no logra alcanzar concentraciones terapéuticas en segmento posterior. Esto se debe principalmente a la eliminación del fármaco a través del drenaje del humor acuoso (*Mandal et al, 2017*). Consecuentemente, para lograr concentraciones adecuadas de fármaco en el humor vítreo y la retina, suele emplearse la inyección directa del medicamento en la cavidad vítrea (*Sheardown y Saltzman, 2006*).

La liberación y distribución de medicamentos administrados por vía intravítrea depende tanto en las propiedades del fármaco como de ciertos parámetros fisiológicos. Así, las moléculas pequeñas son capaces de difundir rápidamente en el vítreo; no obstante, la movilidad de las moléculas grandes (particularmente aquellas cargadas positivamente) se ve restringida.

Por otra parte, los principios activos de bajo peso molecular (<500 Da) tienen una vida media de retención limitada (aproximadamente 3 días) y, por lo tanto, requieren administraciones repetidas. Las moléculas de mayor tamaño (superiores a 500 Da), sin embargo, pueden persistir en el humor vítreo durante varios días o incluso semanas (*Yadav, Verma e Yadav, 2018*).

De este modo, se puede deducir que, en algunos casos para mantener los niveles terapéuticos durante un período prolongado de tiempo, resulta necesario la administración de inyecciones repetidas. Este aumento en la frecuencia de aplicación, suele causar molestias al paciente pudiendo incluso provocar complicaciones, tales como: hemorragia vítrea, infecciones y desprendimiento de retina (*Mandal, Bhist y Mitra, 2017; Raghava, Hammond y Compella, 2004*).

La administración periódica de fármacos a través de inyecciones subconjuntivales o retrobulbares proporciona una alternativa, más segura (representa menor riesgo de dolor ocular, infección, endoftalmitis o hemorragias) y menos invasiva, respecto de las inyecciones intravítreas.

La aplicación del fármaco a nivel subconjuntival es ampliamente utilizada como vía periocular. Consiste en el acceso al espacio subconjuntival a través de una inyección profunda en la conjuntiva bulbar y superficie escleral. Este espacio es altamente expansible siendo capaz de acomodar hasta 500 μL .

La vía subconjuntival puede, además, ser empleada para la liberación sostenida de fármacos siendo factible la obtención de depósitos de medicamentos destinados al tratamiento de enfermedades que afecten al segmento anterior y/o posterior (*Kim, Chiang y Prausnitz, 2014*). Además, la esclerótica proporciona un área relativamente grande para la absorción de fármacos (aproximadamente 17 cm^2) en comparación con otras superficies oculares como la córnea y promueve la permeación de moléculas de gran tamaño. Todos estos factores contribuyen al aumento de la efectividad potencial de esta vía de administración en comparación con otras vías oculares.

De todos modos, el principal inconveniente es que el medicamento necesita difundir desde la zona de inyección hasta el sitio blanco, lo que resulta inevitablemente en pérdidas del principio activo. Referido a esto, si bien la permeación periocular puede mejorar a través de la aplicación de técnicas menos invasivas que las inyecciones intravítreas (depósitos perioculares de fármacos encapsulados en micropartículas, el empleo de de iontoforesis transcleral o sistemas coloidales), éstas no han resultado tan efectivas como los implantes intraoculares o las inyecciones intravítreas (*Varela-Fernández et al, 2020; Kang Mieler, Osswald y Mieler, 2014*).

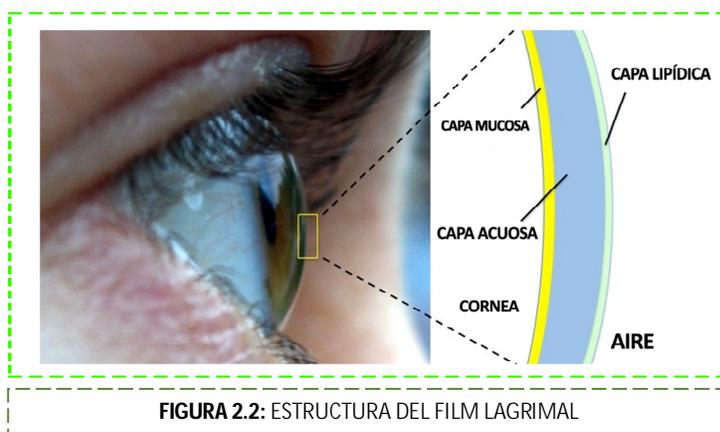
Por lo anteriormente expuesto, resulta extremadamente importante desarrollar un sistema de administración de medicamentos no invasivo que pueda mantener las concentraciones terapéuticas del fármaco en el sitio de acción durante períodos prolongados de una manera segura y efectiva.

ADMINISTRACIÓN TÓPICA – VÍA OFTÁLMICA: BARRERAS OCULARES

A continuación se detallan aspectos de la administración tópica ocular que constituye la vía seleccionada para la aplicación de la fórmula diseñada.

Los colirios comúnmente se instilan en el **FILM LAGRIMAL**. Este film tiene aproximadamente 10 μL de volumen y hasta 10 μm de espesor (*Peng et al, 2011*). Presenta una **estructura trilamelar**, que consiste en una **capa de mucina interna** muy delgada (0,02-0,04 μm) unida al epitelio de la superficie ocular; una **delgada** (0,1 μm)

capa monomolecular de lípidos (contiene lípidos polares y no polares, ésteres, triacilgliceroles, esteroides libres, ésteres de esteroides y ácidos grasos) expuesta al aire y una **capa acuosa intermedia** (7 μm), que ocupa la mayor parte del espesor del film lagrimal y está constituida por electrolitos, proteínas, retinol, inmunoglobulinas y enzimas (Nicolaidis, 1981; Berman, 1991), véase Figura 2.2.



El componente acuoso es secretado principalmente por las glándulas lagrimales accesorias (glándulas de Krauss y Wolfring). Esta capa contiene sales inorgánicas, glucosa y urea así como biopolímeros, proteínas y glicoproteínas.

La capa lipídica, secretada por las glándulas de Meibomio (en el borde del párpado) y las glándulas accesorias sebáceas (glándulas Zeiss), sirve para minimizar la evaporación de las lágrimas (Dart y Willcox, 2013).

El mucus o mucina se obtiene a partir de las células caliciformes. Las mucinas se definen como glicoproteínas fuertemente glicosiladas, con 50 a 80% de su masa compuesta de carbohidratos. Una segunda característica de las mucinas es la presencia, en sus cadenas principales, de repeticiones en tándem de aminoácidos serina y treonina, que proporcionan los sitios para la glicosilación.

Se cree que la glicosilación intensa de las mucinas imparte una carga altamente negativa que es responsable de la hidrofilia de la superficie de la cornea lo que asegura una distribución uniforme del film lagrimal sobre el epitelio corneal.

Asimismo, las mucinas se clasifican como asociadas a la membrana y secretoras. Las mucinas secretoras se dividen en dos grupos: las grandes mucinas formadoras de gel

(responsables de las propiedades reológicas del mucus) y las pequeñas mucinas solubles.

Las mucinas asociadas a la membrana forman el glicocalix, una barrera densa que evita la adherencia y penetración de patógenos en la interfase epitelio corneal-film lagrimal (*Berman, 1991; Gipson, Hori y Argüeso, 2004*).

El film lagrimal cumple varias funciones como: la formación de una superficie refractiva suave, la lubricación de los párpados, el transporte de productos metabólicos (O_2 y CO_2) hacia y desde las células epiteliales de la córnea, la eliminación de cuerpos extraños y acción bactericida (*Craig 2002; Lorentz y Sheardown, 2014*). No obstante, a pesar de los beneficios mencionados ciertos factores asociados a la presencia del film, resultan en una disminución de la concentración del fármaco disponible para la absorción ocular. Entre estos se encuentran: el drenaje a través del conducto nasolagrimal, las pérdidas por recambio lagrimal, unión a proteínas de la lágrima y/o el metabolismo enzimático de los fármacos (*Aiache et al, 1997*).

Asimismo, la composición electrolítica de las lágrimas, el pH y su capacidad buffer son factores que también influyen el efecto terapéutico, la toxicidad y estabilidad del fármaco (*Cholkar et al, 2013*).

En condiciones normales, el volumen total de la película lagrimal de la superficie ocular es de aproximadamente de 7 ± 2 microlitros (μl) y la tasa de secreción lagrimal es de $1,2 \mu l/min$. Por lo tanto, la tasa de eliminación basal (por minuto) se corresponde aproximadamente con el 16% del volumen total de la película lagrimal.

En ausencia de parpadeo, sin pérdidas a través de la hendidura palpebral, el ojo humano puede alojar un volumen de $30 \mu l$. De este modo, tras la instilación de 2 gotas (volumen de $50 \mu l$ /gota) el 70% del volumen total administrado, se pierde por derrame. Al parpadear, el volumen remanente es de $10 \mu l$ lo que supone una pérdida del 90% de volumen administrado (*Ludwig y Reimann, 2015*).

El 10% presente en el área pre-corneal, se mezcla con el volumen de lágrimas para posteriormente, penetrar en córnea y en el epitelio conjuntival (membrana mucosa que cubre la cara posterior de los párpados y se extiende hacia el limbo corneoescleral).

Otra parte drena a través del saco lagrimal y la cavidad nasal, donde puede ser absorbido a nivel sistémico por la membrana mucosa (*Peng et al, 2011*).

A su vez, una fracción del medicamento que permea en la conjuntiva puede también ingresar a la circulación sistémica debido a la alta vascularización del tejido, siendo la cantidad de fármaco absorbido en conjuntiva significativamente superior a la absorbida en córnea como consecuencia de su mayor área y permeabilidad (Hosoya, Lee y Kim, 2005).

Por otra parte, para alcanzar la cámara anterior, los fármacos capaces de penetrar en córnea, deben difundir a través de tres capas: el epitelio, el estroma y el endotelio, véase Figura 2.3 (Peng et al, 2011).

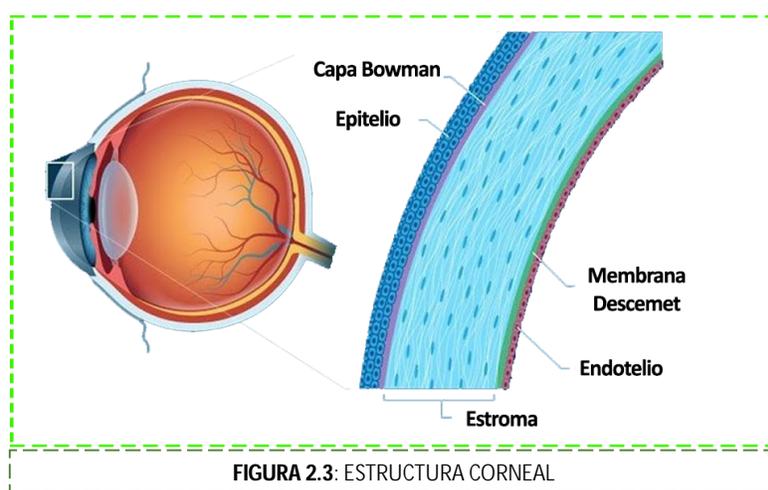


FIGURA 2.3: ESTRUCTURA CORNEAL

La capa más externa, el EPITELIO CORNEAL, es estratificado no queratinizado y presenta un espesor de 50 a 90 μm (Gipson, 1994). Contiene un 90% de las células totales de la córnea lo que lo hace altamente hidrofóbico. Las células superficiales epiteliales maduras actúan como una barrera para la absorción del fármaco ya que están estrechamente vinculadas por la adhesión celular a proteínas conocidas como ocludinas ZO-1 y ZO-2. Estas proteínas proporcionan un sello continuo alrededor de las células evitando el transporte paracelular (a través de espacios intercelulares) del fármaco en la córnea (Yi, Wang e Yu, 2000).

La difusión paracelular de moléculas iónicas (polares) se ve impedida por las uniones estrechas de la córnea, mientras que los fármacos hidrófobos difunden con facilidad a través del mecanismo transcelular.

Dado lo anteriormente expuesto, se puede concluir que las propiedades fisicoquímicas de las moléculas (el grado de ionización y el pH de las fórmulas oculares)

constituyen los principales factores que determinan la permeabilidad a través del epitelio corneal (*Cholkar et al, 2013*).

Por debajo del epitelio, se encuentra la segunda capa de la córnea que es el ESTROMA, constituido por colágeno. El estroma corneal comprende el 95% del espesor total de la córnea. Consiste en queratocitos, células fibroblásticas, tejido nervioso y células de Schwann (*Del Monte y Kim, 2011*). Presenta en su parte anterior una condensación de fibras que se conoce como lámina de Bowman que sirve de anclaje a la membrana basal del epitelio. La capa de Bowman no cumple un rol significativo en lo que respecta a la limitación de la difusión de los fármacos a nivel ocular.

A diferencia de esta capa, el estroma hidrófilo se comporta como una barrera limitante para la difusión de moléculas solubles en lípidos, dificultando la permeación a los tejidos oculares profundos. No obstante, puede actuar como reservorio de medicamentos altamente hidrófilos. De igual modo, el epitelio corneal funciona como depósito de fármacos hidrofóbicos (*Cholkar et al, 2013*).

En la cara posterior, el estroma corneal presenta una membrana transparente constituida por colágeno y fibras elásticas, conocida como membrana de Descemet. Esta membrana, que constituye la membrana basal de la capa posterior de la córnea o **ENDOTELIO**, no limita significativamente la difusión de fármacos. Sin embargo, el endotelio está formado por una única capa de células hexagonales íntimamente vinculadas entre sí por uniones desmosómicas y una zónula de oclusión (zónula occludens) que impide la difusión de moléculas y o partículas superiores a 20 nm (*Cholkar et al, 2013; Bisht et al, 2018*).

Asimismo, una fracción del fármaco que atraviesa la córnea, puede distribuirse a través del humor acuoso hacia tejidos tales como el cristalino, cuerpo ciliar, vítreo, úvea-retina o eliminarse a través de la circulación sanguínea de la úvea anterior y/o el drenaje del humor acuoso (*Le Boursais et al, 1998; Peng et al, 2011*).

El humor acuoso es un líquido claro presente en las cámaras anterior y posterior del ojo. Proporciona a estas estructuras oculares avasculares (cristalino, cornea) nutrientes, oxígeno, elimina productos de excreción del metabolismo, estabiliza la estructura ocular y contribuye a la regulación de la homeostasis de estos tejidos oculares (*Cholkar et al, 2013*).

Este fluido se segrega de manera continua ($2,5 \mu\text{l}/\text{min}$ en humanos) a partir de plasma a través de las células epiteliales del cuerpo ciliar y fluye a través de la pupila hacia la cámara anterior abandonando el ojo a través de la malla trabecular en el canal de Schlemm (*Cunha-Vaz et al, 2016*), véase Figura 2.4.

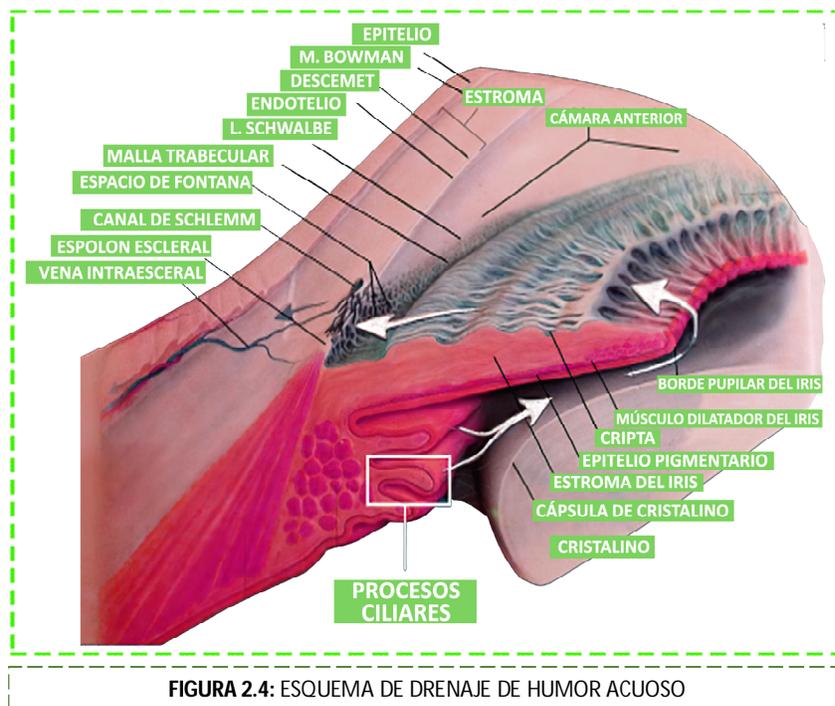


FIGURA 2.4: ESQUEMA DE DRENAJE DE HUMOR ACUOSO

La eliminación del fármaco a partir del humor acuoso puede ocurrir a través de dos mecanismos: por drenaje hacia el canal de Schlemm y por fenómeno de absorción en la coroides anterior. En el primer caso, la eliminación no depende de las propiedades particulares del fármaco y está determinada por las características del flujo convectivo. En el segundo caso, depende de la hidrofobia del fármaco dado que para ser eliminado por el flujo sanguíneo uveal debe atravesar el endotelio de los vasos sanguíneos (*Nettey et al, 2016*).

Por otra parte, el epitelio no pigmentado del cuerpo ciliar y el endotelio de los capilares ciliares y del iris, constituyen la denominada barrera hematoacuosa (BHA). Esta barrera presenta uniones estrechas a nivel celular y regula el intercambio de solutos entre el segmento anterior y posterior manteniendo el equilibrio químico de los fluidos oculares (*Occhiutto et al, 2012*).

El epitelio de los procesos ciliares es una de las únicas membranas que impide el paso de la mayoría de las moléculas, incluyendo antibióticos y proteínas. En este

sentido, la barrera hemato-acuosa funciona como impedimento para el acceso de los fármacos a los tejidos profundos de la estructura ocular (*Cholkar et al, 2013*).

Por lo expuesto anteriormente, se puede concluir que la estructura anatómica del ojo así como los mecanismos fisiológicos de lavado de sustancias presentes en la superficie ocular, hacen que la administración tópica de medicamentos se vuelva ineficiente.

Sólo el 2-5% del fármaco administrado alcanza los tejidos intraoculares diana. Las microemulsiones o/w aumentan la solubilidad aparente en agua de fármacos hidrófobos. Tras la instilación, las gotas de aceite actuarían como reservorio liberando de modo continuo el fármaco al film lagrimal a medida que este va difundiendo a través de la córnea (*Peng et al, 2011*). Estos sistemas, también incrementan la permeabilidad corneal, efecto que sumado a las propiedades de liberación sostenida los convierten en un vehículo atractivo para la administración ocular de medicamentos (*Bachu et al, 2018*).

GLAUCOMA

Se puede definir al Glaucoma como un grupo de trastornos oculares de etiología multifactorial unidos por una característica clínica, la neuropatía óptica, que es potencialmente progresiva (*Foster et al, 2002*).

Esta enfermedad, se caracteriza por un aumento de la presión intraocular asociada a la pérdida de la visión gradual consecuencia de daños en el disco óptico. Usualmente, no genera síntomas y constituye la segunda causa de ceguera a nivel mundial (*Gooch et al, 2012*).

El aumento de la presión intraocular (PIO) (superior a los 21 mmHg) se debe fundamentalmente a un desequilibrio entre la producción y el drenaje del humor acuoso debido fundamentalmente al fenómeno de resistencia a la salida del mismo hacia la circulación sistémica (*Andrew, Franzco y Casson, 2020; Carreon et al, 2017; Kaufman y Rasmussen, 2012*). La presencia de altos niveles de (PIO) constituye el factor de riesgo más importante asociado al inicio y progresión de la enfermedad (*Caprioli, 2008*) siendo el único que actualmente puede ser controlado y tratado.

De este modo, la disminución de la PIO constituye la terapia más eficiente y clínicamente aceptada para evitar el deterioro del nervio óptico y la progresión de la pérdida visual. Actualmente, la farmacoterapia se basa en el empleo de gotas oftálmicas y geles que posibilitan alcanzar valores de PIO más bajos, al disminuir la producción de humor acuoso o estimular su salida (*Gooch et al, 2012*).

DESVENTAJAS DE LA ADMINISTRACIÓN TÓPICA EN PACIENTES CON GLAUCOMA

La pérdida de visión a causa de glaucoma no es recuperable. De este modo, todos los tratamientos tópicos de la enfermedad están destinados a prevenir el daño, más que a mejorar la función visual. Consecuentemente, el paciente no suele observar beneficios inmediatos tras la administración del/los colirios lo que deriva en un incumplimiento del tratamiento tópico constituyendo esto la principal causa de avance de la enfermedad (*Gooch et al, 2012*).

Por otra parte, la variación fisiológica de la PIO ocurre en ciclos rítmicos regulares, compensados a través de la activación de mecanismos tendientes a preservar el tejido ocular. Si este estado estacionario se perturba, por incrementos irregulares/anormales de la PIO, el tejido no logra compensar la variación en la presión dañándose a largo plazo (*Caprioli, 2008*).

Resulta necesario mencionar que, si bien las gotas antiglaucomatosas disminuyen efectivamente la PIO, son incapaces de mantener los niveles de presión bajos. Consecuentemente, si sumado al aumento anormal de la tensión intraocular, el paciente no respeta la frecuencia de aplicación, el control de la presión ocular se vuelve deficiente. Las fluctuaciones diarias, semanales e incluso mensuales hacen que la enfermedad progrese generándose una importante pérdida de visión (*Gooch et al, 2012*).

Por todo lo expuesto, se presume que lo ideal es el empleo de formulaciones tópicas que presenten un perfil de liberación sostenido.

TRATAMIENTO DE LA ENFERMEDAD DE GLAUCOMA

Los agentes terapéuticos empleados para el tratamiento de la enfermedad de glaucoma reducen la presión intraocular, limitando la producción de humor acuoso en

los procesos ciliares y estimulando la salida a través de la malla trabecular. Entre los fármacos que se usan para el tratamiento de glaucoma se incluyen: Antagonistas Beta Adrenérgicos, Agonistas Alfa Adrenérgicos, Análogos de Prostaglandinas e Inhibidores de Anhidrasa Carbónica (IAC) (*Chen et al, 2019*).

INHIBIDORES DE ANHIDRASA CARBONICA (IAC)

La Anhidrasa Carbónica (AC) es una enzima que cataliza la reacción de $H_2O + CO_2$ para formar H^+ y HCO_3^- . El HCO_3^- es el ion responsable del movimiento de los iones a nivel ocular.

El agua acompaña al ion Na^+ para formar el humor acuoso. La inhibición de la Anhidrasa Carbónica (AC) por agentes como Acetazolamida (ACZ) disminuye la concentración de HCO_3^- y el flujo de Na^+ agua hacia la cámara posterior resultando entonces una disminución en la producción del humor acuoso y por lo tanto una reducción de la PIO (*Hollo, 2015*).

MEDICACIÓN SISTÉMICA

ACZ en forma tópica no se encuentra disponible en el mercado como consecuencia de sus principales limitaciones: la baja solubilidad acuosa (0,7 mg/ml) y el reducido coeficiente de permeabilidad ($4,1 \times 10^{-6}$ cm/seg) (*Kaur et al, 2002; Kaur, Singh y Kanwar, 2000*).

En nuestro país los inhibidores de anhidrasa carbónica empleados, ACETA (Laboratorio NOVOPLOS) y DIABO (Laboratorio MAX VISION), se comercializan como comprimidos de 250 mg; en otros países en la forma de comprimidos de 125 o 250 mg y cápsulas de liberación sostenida de 250 o 500 mg. Cabe destacar que, la máxima reducción de PIO (valores que superan el 20 al 30%) se obtiene con comprimidos de 250 mg 4 veces diarias o de 500 mg de liberación sostenida 2 veces por día. Consecuentemente, para obtener una disminución adecuada de la PIO se requieren altas dosis lo que está directamente relacionado con la aparición de efectos adversos (*Kaur et al, 2002*).

Entre los efectos secundarios se incluyen: miopía, fotosensibilidad, urticaria, hematuria, parestesias en extremidades, perturbaciones gastrointestinales, náuseas,

anorexia, diarrea y constipación. Asimismo, eventualmente ACZ puede causar complicaciones que incluyen Síndrome de Steven Johnson, eritema multiforme, necrolisis epidérmica tóxica, acidosis metabólica, anafilaxia, delirio agudo y depresión (*Lehmann-Horn, Rüdél y Jukart, 2004*).

MEDICACIÓN TÓPICA

Desde hace años, resulta atractivo el diseño de formulaciones tópicas de IAC capaces de evitar los efectos sistémicos del medicamento administrado vía oral. El principal objetivo estuvo orientado a mejorar permeación del fármaco en córnea y la solubilidad en agua, habiéndose diseñado formulaciones tópicas de ACZ e IACs tentativas, que incluían el empleo de elevadas concentraciones del fármaco, sales de ACZ y sales de IAC (*Lotti, Schmitt y Gautheron, 1984*), análogos de IAC así como nuevos sistemas de liberación: liposomas (*El-Gazayerly y Hikal, 1997*), ciclodextrinas (*Loftsson et al, 1994*), entre otros.

Referido a las modificaciones estructurales, se efectuaron variaciones de los IAC existentes resultando finalmente el desarrollo de dos formulaciones tópicas efectivas: Dorzolamida (DZ) (*Trusopt, Merck e Co., Inc., Rahway, NJ*) y Brinzolamida (BZ) (*Azopt, Laboratorio ALCON, Inc., Houston, Texas*). Estas fórmulas constituyeron los primeros IAC tópicos aprobados por la US-FDA para el tratamiento del glaucoma primario de ángulo abierto (*Reolini y De Vience, 2020*).

Si bien la aplicación oftálmica de los compuestos anteriormente mencionados logró reducir la incidencia de efectos adversos ocasionados tras la administración oral, se ha observado absorción a nivel sistémico pudiendo tener lugar el mismo tipo de efectos adversos y reacciones atribuibles a las sulfonamidas administradas vía oral.

Por otra parte, se comprobó que en ensayos clínicos, el Clorhidrato de (DZ) (2%) presenta menor efectividad que ACZ administrada sistémicamente.

Entre los IACs disponibles, la administración oral de ACZ continúa siendo la opción más efectiva para el tratamiento de glaucoma (*Kaur, Singh y Kanwar, 2000*).

Timolol (TM) es un beta bloqueante no selectivo que al igual que el resto de los fármacos incluidos en este grupo compite con las catecolaminas por los receptores beta adrenérgicos. Es soluble en agua y atraviesa con facilidad la córnea. Está

comercialmente disponible como maleato de TM a concentraciones 0,1%, 0,25%, 0,5% siendo esta última concentración la más empleada (*Dunn y Frohlich, 1981*).

Un interesante trabajo fue el realizado por Berson y Epstein (1981) quienes compararon la disminución de la PIO tras la administración de ACZ oral, TM tópico y la combinación de los anteriores, habiéndose observado un aumento en la efectividad relacionado a la asociación de fármacos.

Por otro lado, se determinó la administración concomitante de DZ al 2% (tres veces por día) con TM 0,5% (dos veces diarias), mostraba un efecto aditivo en pacientes con glaucoma de ángulo abierto o hipertensión ocular (*Michaud y Friren, 2001*).

Asimismo, la asociación de BZ-TM produce un descenso similar al producido por DZ-TM. No obstante, la aparición de efectos secundarios resulta inferior para la asociación TM-BZ respecto de TM-DZ, observándose un menor grado de irritación local (*Altafini et al, 2015; Sall y The Brinzolamide Primary Therapystudy Group, 2000*).

Lo antes descrito justifica el empleo de una combinación ACZ-TM como modelo capaz de inferir la potencialidad de las microemulsiones como sistemas portadores de fármacos hidrofóbicos e hidrófilos de uso oftalmológico.

DISEÑO DE FORMULACIÓN TÓPICA DE ACETAZOLAMIDA

CONSIDERACIONES INHERENTES A LA FÓRMULA

Un gran número de factores pueden causar irritación ocular una vez instilada la gota, entre ellos se incluyen: el volumen instilado, el pH, la osmolaridad y características químicas del fármaco.

Estos factores pueden aumentar el drenaje lagrimal por efecto reflejo lo que posiblemente disminuya la biodisponibilidad ocular del fármaco y deben ser contemplados durante el proceso de diseño de la fórmula. Asimismo, deben considerarse aspectos asociados a la seguridad de la formulación tales como: su esterilidad, toxicidad e irritación ocular así como la cantidad de conservantes a ser empleada (*Van Ooteghem, 1993*).

En este sentido, cabe aclarar que si bien se han evaluado los factores anteriormente mencionados, no ha sido el objetivo de este trabajo de tesis analizar en detalle los efectos inherentes a los aspectos antes citados dado que la complejidad de los fenómenos involucrados hubiera derivado en la utilización de un número grande de

animales de experimentación, siendo otro el enfoque primario de nuestras investigaciones.

CARACTERÍSTICAS FISICOQUÍMICAS DEL FÁRMACO

Las propiedades fisicoquímicas más importantes en términos de biodisponibilidad ocular son aquellas que afectan la permeabilidad en cornea. Esto incluye la hidrofobicidad reflejada a través del coeficiente octanol/agua (P), la carga y propiedades ácido-base determinadas por su pKa.

COEFICIENTE DE PERMEACIÓN

La lipofilia y la permeabilidad corneal tienen una relación sigmoidea. Como se mencionó anteriormente, resulta más fácil que un medicamento lipofílico penetre a través del epitelio corneal. La lipofilia de una molécula, se mide utilizando un coeficiente de partición (P) que se define como la relación de concentración de soluto solubilizado en octanol y agua. Valores de log P que varíen de 2 a 4 dan como resultado una óptima permeación a nivel corneal. No obstante, la capa interna de la córnea (estroma) requiere mayor hidrofilia para una permeación adecuada. Por lo tanto, para que un medicamento tenga una penetración óptima a través de la córnea, debe estar no ionizado, y presentar una solubilidad acuosa y lipofilia óptimas (*Khurana et al, 2014*). Solo los fármacos con coeficientes de partición (P) entre 10-100, que muestren propiedades de solubilidad tanto en agua como en lípidos son capaces de pasar a través de la córnea (*Rupenthal y Alany, 2008*).

El log P (ACZ) a pH 7,39= -0,26 (*Berthod et al, 1999*).

De este modo, en el caso de compuestos iónicos (ácidos y bases débiles), la permeación está determinada por el equilibrio entre la forma ionizada y la no ionizada tanto en el sistema de liberación como en el fluido lagrimal.

pKa

Como se ha mencionado anteriormente, para que un fármaco pueda ejercer su acción a nivel intraocular, debe atravesar el film lagrimal y la córnea. Su pasaje a través de barreras hidrófilas y lipófilas quedará condicionado por su tamaño molecular y pKa;

este último y el pH del medio determinan la fracción ionizada (polar) y no ionizada (apolar).

La carga de la molécula ejercerá efecto en la permeación. Los espacios intercelulares del epitelio corneal, a pH fisiológico, están cargados negativamente. Esto se debe a la presencia de grupos carboxilos en las proteínas de las uniones estrechas. Como resultado, las moléculas cargadas negativamente experimentan dificultad en la permeación debido a las fuerzas de repulsión generadas. Asimismo, la interacción iónica entre moléculas cargadas positivamente y los mencionados grupos carboxílicos, también representa un obstáculo para la permeación (Nettey et al, 2016).

En la Figura 2.5, se esquematiza el proceso de permeación de un fármaco a través de la córnea. Una vez administrado, éste requiere de cierta hidrosolubilidad para disolverse en la capa acuosa de la película de fluido lagrimal; tras la disolución será la fracción no ionizada la que atravesará con facilidad el epitelio de la córnea y accederá al estroma desde donde la forma ionizada difundirá fácilmente hasta alcanzar el endotelio. Nuevamente, la fracción no ionizada atravesará con mayor facilidad el endotelio alcanzando el humor acuoso (Domenech et al, 2013).

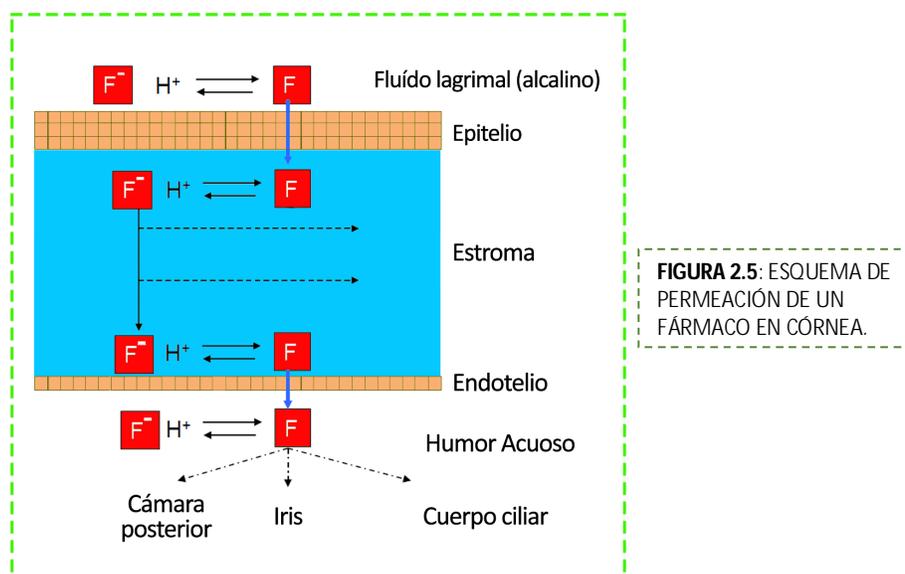


FIGURA 2.5: ESQUEMA DE PERMEACIÓN DE UN FÁRMACO EN CÓRNEA.

ACZ es levemente ácida ($pka= 7,2$) por lo que el incremento del pH entre 6-8 aumentaría la fracción de fármaco ionizado disminuyendo la permeación en córnea. Asimismo, el pH de la formulación debe mantenerse ácido (menor a 5) para evitar, además, su degradación (Parasrampuria, 1998).

TAMAÑO MOLECULAR

El tamaño molecular del fármaco tiene un efecto en la absorción corneal. La córnea es impermeable a moléculas mayores de 5.000 Da, sin embargo los tejidos conjuntivales admiten la permeación de compuestos que superan los 20.000 Da (*Rupenthal y Alany, 2008*).

CAPACIDAD DE BUFFER Y pH

El pH normal del fluido lagrimal es 7.4. Las formulaciones oculares idealmente deben ser formuladas entre pH 7,0 y 7,7 para evitar la irritación del ojo. No obstante, en la mayoría de los casos, el pH necesario para la solubilidad o estabilidad máxima del fármaco puede estar fuera de este rango (*Rupenthal y Alany, 2008*).

Cabe destacar que, diferentes valores de pH pueden ser tolerados a nivel ocular; si la preparación se encuentra ligeramente tamponada, las lágrimas son capaces de ajustar el pH a niveles fisiológicos. Consecuentemente, el pH de las sustancias terapéuticas aplicadas en forma de gotas puede variar desde 3,5 hasta 8,5 (*Ammar et al, 2009*).

PRESIÓN OSMÓTICA

La osmolaridad del fluido lagrimal depende principalmente del número de iones disueltos en la capa acuosa del film lagrimal y normalmente oscila entre 310 y 350 mOsm/kg (*Rupenthal y Alany, 2008*).

Cuando se instila una solución oftálmica, esta se mezcla con el fluido lagrimal resultando una presión osmótica que es dependiente de la osmolaridad de las lágrimas, de la de la formula y del volumen administrado.

En general, las soluciones hipotónicas son mejor toleradas por los tejidos oculares que las hipertónicas, que conducen a un aumento de la secreción lagrimal (*Rupenthal y Alany, 2008*).

Si la tonicidad de la formulación es menor a 100 mOsm/kg o superior a 640 mOsm/kg, la formula se convierte en irritante, induce lagrimeo reflejo y parpadeo, y es por lo tanto, probable que se reduzca la biodisponibilidad de los fármacos instilados (*Ammar et al, 2009*).

No obstante, se ha reportado para microemulsiones que rangos entre 1.200-2.400 mOsm/kg no causaron irritación. Asimismo, la osmolaridad de fórmulas no isotónicas se recupera 1 a 2 min transcurrida la instilación, dependiendo del tamaño de la gota (*HaBe y Keipert, 1997*).

VISCOSIDAD

La instilación de una fórmula puede influir en el comportamiento normal de lágrimas. Por lo general, los sistemas con baja viscosidad permiten una buena tolerancia y escaso dolor y parpadeo luego de la aplicación. Sin embargo, los sistemas de mayor viscosidad, aunque resultan menos tolerados, inducen un aumento en tiempo de contacto ocular mediante la reducción de la tasa de drenaje lagrimal y, como consecuencia, mejoran la biodisponibilidad (*Zignani, Tabatabay y Gurny, 1995*).

Se requiere para las gotas oftálmicas una viscosidad inferior a 20,0 mPa (*Peng et al, 2011*).

TENSIÓN SUPERFICIAL

La película lagrimal se desestabiliza cuando la tensión superficial de gotas oftálmicas es mucho menor que la tensión superficial del fluido lagrimal (40-50 mN/m).

La presencia de valores de tensión superficial semejantes al de las lágrimas garantiza un buen efecto difusor en córnea y por tanto, mejor capacidad de interacción entre el fármaco y el epitelio corneal (*Ammar et al, 2009*).

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

- Obtención de un sistema o/w que pudiera formarse con un porcentaje mínimo de agentes surfactantes y solubilizar en simultáneo óptimas cantidades de fármacos con escasa solubilidad acuosa (ACZ) e hidrosolubles (TM), destinados particularmente al tratamiento de la enfermedad de Glaucoma.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar estudios *in vivo* en animales de experimentación (conejos) que permitan determinar el *grado de irritación* de las fórmulas seleccionadas (caracterizadas en el capítulo anterior) a fin de evaluar la factibilidad de aplicación a nivel ocular.
- Desarrollar técnicas analíticas que permitan determinar la concentración de fármaco (ACZ) efectivamente cargada en las microemulsiones diseñadas.
- Evaluar la performance de las microemulsiones obtenidas desde el punto de vista farmacéutico a través de ensayos *in-vivo* efectuados sobre conejos.

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES

Surfactantes: Brij 35, Cremophor EI, Tween 80 (Sigma Aldrich). Fase interna: Aceite Esencial de Citronella (Parafarm). Polímeros no iónicos: Polietilenglicol 400 (PEG 400 - cosurfactante/cosolvente) (Parafarm), Propilenglicol (cosurfactante-cosolvente) (Parafarm). Fármaco soluble en la fase acuosa externa: Timolol Maleato (TM) (Parafarm). Fármaco a solubilizar en la estructura interna de la microemulsión: Acetazolamida (ACZ) (Parafarm). Fase externa: Solución Fisiológica.

Productos comerciales antiglaucomatosos:

AZARGA (Brinzolamida 10 mg/ml – 5 mg/ml de Timolol Base como Timolol Maleato)- Lab Alcon.

Solución Comercial Timolol Maleato (5 mg/ml de Timolol Base) - Lab. Sidus.

ANIMALES

Se utilizaron conejos albinos tipo New Zealand de 2 a 2,5 kg.

El procedimiento de manejo animal estuvo conforme a la ARVO (Asociación para la Investigación en Visión y Oftalmología) atendiendo a una resolución (European Communities Council Directive-86/609/CEE) sobre el uso de animales en la investigación y a lo estipulado por Comité de ética de protocolos experimentales en el uso de animales en proyectos científicos, correspondiente a la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Nacional de Córdoba.

Los conejos fueron provistos de agua y alimentos *ad libitum* y se encontraban en un ambiente de temperatura controlada de 21 °C ± 5 expuestos a ciclos 12 h luz - 12 h oscuridad. Luego de una semana de adaptación en las instalaciones, los animales fueron admitidos para las sesiones experimentales.

MÉTODOS

VISCOSIDAD

Las mediciones de viscosidad se realizaron por triplicado a $25 \pm 0,1$ °C usando un viscosímetro AND SV-10.

DENSIDAD

Las mediciones de densidad se efectuaron por triplicado a 25 °C, con un densímetro Antón Para DMA 35 N.

TENSIÓN SUPERFICIAL

Las mediciones de la tensión superficial fueron llevadas a cabo a 25 °C usando un Tensiómetro Kruss.

pH

El pH se midió a 25 °C utilizando pHmetro Orion 710 A.

OSMOLARIDAD

Las mediciones de la osmolaridad se realizaron por triplicado con un Osmómetro Osmomat 030-D crioscópico, utilizando una solución de cloruro de sodio como referencia (0,303 Osm/kg).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

SELECCIÓN DE COMPONENTES

A los fines de evitar irritación de los tejidos oculares, el empleo de excipientes biodegradables con perfiles de seguridad conocidos adquiere particular importancia en la fabricación de formas farmacéuticas de uso oftálmico. Los tensioactivos no iónicos, tales como Tween 80, Cremophor RH 40, Span 60 y Brij 35 se incluyen en la Guía de Excipientes aprobados y recomendados como seguros por la FDA (FDA IIG).

Estos surfactantes tienen aplicación en la administración de fármacos de uso oftálmico al exhibir menor toxicidad e irritación ocular y mayor biocompatibilidad respecto de los surfactantes aniónicos, catiónicos y anfóteros. Además, muestran una gran tendencia a mantenerse próximo al pH fisiológico (*Mazyed y Abdelaziz, 2020*).

Tween 80 ha sido clasificado prácticamente como no irritante. Debido a su seguridad, es ampliamente empleado en preparaciones oftálmicas encontrándose incluido dentro de los listados sugeridos por la Farmacopea de Estados Unidos, la Farmacopea Europea y Japonesa.

Por otro lado, según información procedente del fabricante, la instilación de 0,05 ml de Cremophor EL en el saco conjuntival de conejos causa irritación leve, la cual desaparece al término de unas pocas horas. No obstante, la administración ocular de soluciones de Cremophor EL al 30%, no genera irritación alguna (*Ammar et al, 2009*).

Finalmente, a través de estudios se ha comprobado que la combinación de Cremophor EL, Tween 80 (1:1) logra incrementar la solubilidad de algunos aceites, resultando ello en un aumento del área de existencia de la microemulsión (*Ammar et al, 2009*). Sumado a esto, ambos surfactantes demostraron capacidad promotora de la permeación corneal (*Van der Bijl, Van Eyk y Meyer, 2001*).

Por otra parte, Brij 35, Brij 78, Brij 98 se encuentran dentro de los tensioactivos no iónicos para los cuales se reportó un incremento significativo de la permeación corneal a concentraciones del 0,05% (*Saettone et al, 1996; Burgalassi et al, 2001*).

Además de lo expuesto anteriormente, otro criterio adicional empleado para la selección de surfactantes fue el valor de BHL. Desde el punto de vista teórico, los

surfactantes con valores de BHL bajos (3-6) se emplean para la formación de microemulsiones w/o. No obstante, los tensioactivos con BHL elevados (8-18) resultan necesarios para la formación de microemulsiones o/w (*Manoharan, Basakar y Singh, 2010; Preethi et al, 2015*). Así, los surfactantes empleados Tween 80, Cremophor EI, Brij 35 presentan valores de BHL de 15, 12-14, 16,9 respectivamente (*Ammar et al, 2009; Tiirkylmaz et al, 1998*).

En lo referente a las fases internas empleadas, se ha detectado especial afinidad entre el sistema de surfactantes seleccionado y los aceites esenciales (aceite de citronella, aceite de geranio) así como sus componentes (geraniol).

Estos aceites o los compuestos fitoquímicos que los constituyen consisten por lo general en una mezcla de componentes que es probable que, al contener cadenas hidrocarbonadas considerablemente más cortas que la región hidrófoba constituida por los surfactantes poliméricos empleados, otorguen al aceite una mayor capacidad de penetración en la región interfacial de los tensioactivos resultando en una eficiente formación del sistema (espontaneidad de formación) así como en un aumento de la solubilidad de la fase oleosa.

La presencia de grupos polares en la estructura del aceite podría, también, dar lugar a fuertes interacciones entre los surfactantes lo que disminuye la tensión interfacial favoreciendo la formación de microemulsiones (*Peng et al, 2011; Minaña-Perez et al, 1995*).

Asimismo, se añadieron cosolventes (Propilenglicol y Polietilenglicol) con el objeto de aumentar la solubilidad del fármaco y estabilizar la fase dispersa. Estos compuestos, crean un ambiente más hidrófobo al reducir la constante dieléctrica del agua e incrementar la cantidad de moléculas de surfactante presentes en fase acuosa. Referido a esto último, la disponibilidad de monómeros de surfactante, favorecería la solubilidad del fármaco al crear regiones hidrófobas en la fase externa.

Dichos solventes orgánicos disuelven, además, gran cantidad de principio activo hidrofóbico o surfactantes hidrófilos en bases lipófilas actuando también como cosurfactantes en emulsiones y microemulsiones (*Preethi, Kaushik y Chanky, 2015; Chavda y Shah, 2017; Tekade et al, 2017*)

Cabe destacar que se han evidenciado mejoras en el perfil de liberación de fármacos las cuales estarían directamente asociadas a las cantidades de estos co-surfactantes/cosolventes incorporados a las formulaciones (*Sapra et al, 2012*).

CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA - FÓRMULA FINAL DE CITRONELLA Y PRECURSORES
MEDICIÓN DE TAMAÑO PARTICULAR, VISCOSIDAD, DENSIDAD, PH, OSMOLARIDAD

SISTEMA CITRONELLA - BRIJ 35 - CREMOPHOR EL - TWEEN 80 - AGUA BIDEDESTILADA (SISTEMA I)	
COMPOSICIÓN	CREMOPHOR EL (2,38%) - BRIJ 35 (2,38 %) - TWEEN 80 (4,76 %) - ACEITE DE CITRONELLA (2,38 %) - AGUA BIDEDESTILADA (88,10 %).
NÚMERO DE MUESTRAS EVALUADAS	(n=3)
VISCOSIDAD	1,75 ± 0,02 cP (25 °C)
DENSIDAD	1,0047 ± 0,0002 g/ml (25 °C)
pH	6,14 ± 0,16 (25 °C)
OSMOLARIDAD	82 mOsm/kg

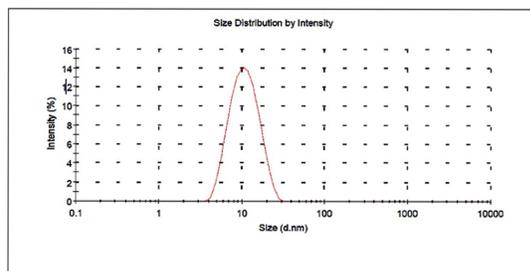
**SISTEMA CITRONELLA - BRIJ 35 - CREMOPHOR EL - TWEEN 80 - SOLUCIÓN FISIOLÓGICA
(SISTEMA II)**

COMPOSICIÓN	CREMOPHOR EL (2,38%) - BRIJ 35 (2,38 %) - TWEEN 80 (4,76%) - ACEITE DE CITRONELLA (2,38 %) - SOLUCIÓN FISIOLÓGICA (88,10%).
PARÁMETROS EVALUADAS	(n=3)
TENSIÓN SUPERFICIAL	33,7 ± 0,06 mN/m
VISCOSIDAD	1,85 ± 0,03 cP (25 °C)
DENSIDAD	1,0105 ± 0,0002 g/ml (25 °C)
pH	5,83 ± 0,04 (25 °C)
OSMOLARIDAD	405 mOsm/kg

Results

	Diam. (nm)	% Intensity	Width (nm)
Z-Average (d.nm): 9,734	Peak 1: 11,37	100,0	4,371
Pdl: 0,139	Peak 2: 0,000	0,0	0,000
Intercept: 0,950	Peak 3: 0,000	0,0	0,000

Result quality **Good**



(SISTEMA II)

Tras haber realizado algunas modificaciones sobre el Sistema II, (adición de polímeros a la fase externa, adición de fármacos lipo e hidrosolubles) se obtuvo la formula final, destinada a la aplicación ocular (SISTEMA III).

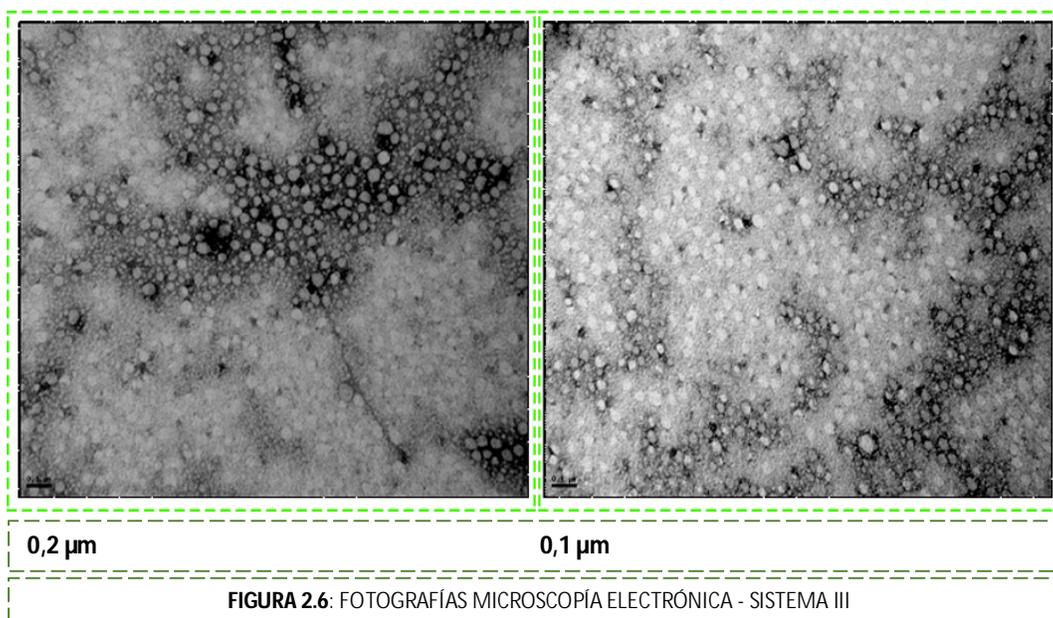
SIST. CITRONELLA - ACZ- CREMOPHOR EL - BRIJ35 - TWEEN80 - TIMOLOL MALEATO - SOLUCIÓN FISIOLÓGICA - POLÍMEROS (SISTEMA III)	
COMPOSICIÓN	CREMOPHOR EL (2,33%) - BRIJ 35 (2,33 %) - TWEEN 80 (4,66 %) - ACEITE DE CITRONELLA (2,33 %) – SOLUCIÓN FISIOLÓGICA (86,29%) – PEG 400 (0,69%) – PROPILENGLICOL (0,52%) ACZ (0,26%) – TIMOLOL MALEATO (0,59%)
PARÁMETROS EVALUADAS	(n=3)
TENSIÓN SUPERFICIAL	34 ± 0,1 mN/m
VISCOSIDAD	2,42 ± 0,03 cP (25° C)
DENSIDAD	1,0150 ± 0,0002 g/ml (25° C)
pH	4,8 ± 0,01 (25° C)
OSMOLARIDAD	636 mOsm/kg

RESULTS			
	Diam. (nm)	% Intensity	Width (nm)
Z-Average (d.nm): 10.26	Peak 1: 11.62	100.0	4.385
Pdi: 0.155	Peak 2: 0.000	0.0	0.000
Intercept: 0.928	Peak 3: 0.000	0.0	0.000
Result quality Good			

Size Distribution by Intensity

(SISTEMA III)

MICROSCOPÍA ELECTRÓNICA



Referido a la medición de los parámetros fisicoquímicos, es importante destacar que, como se mencionó anteriormente, el objetivo central de esta Tesis ha sido el diseño de microemulsiones capaces de transportar fármacos de diferente solubilidad y la evaluación preliminar de su potencial aplicación tópica, no siendo nuestra prioridad la obtención de una forma farmacéutica final considerando todas las variables.

EVALUACIÓN DE CAPACIDAD DE CARGA DEL SISTEMA: HPLC

HPLC: para determinar la concentración de fármaco incorporado al sistema se utilizó Cromatografía Líquida de Alta Performance.

El sistema HPLC estaba compuesto por una bomba AGILENT 1100 HPLC, y un detector AGILENT 1100 HPLC (Agilent Technologies). La medición se realizó a 245 nm.

La muestra fue cromatografiada en una columna fase reversa Luna_ C18 (250 X 4.6mm, 5 μm , Phenomenex) con una precolumna del mismo material de 2x8 mm.

La fase móvil, consistió en 20 % Acetonitrilo (ACN) y 80% de solución buffer 0,1 M de acetato de ajustada a pH 4,5 con ácido acético glacial. El flujo de esta fase fue de 1 ml/min. La columna se encontraba termostatazada a 25 °C.

Vehículos ensayados, véase Tabla 2.1.

- Microemulsión Citronella - Solución Fisiológica - Polímeros (PEG 400 - Propilenglicol)
- Microemulsión Citronella - Solución Fisiológica
- Microemulsión Citronella - Agua Bidestilada
- Solución Micelar - Solución Fisiológica
- Solución Fisiológica - Polímeros
- Agua Bidestilada
- Solución Fisiológica
- Aceite de Citronella

Estos vehículos se dejaron en contacto durante 24 h con ACZ a fin de obtener muestras saturadas de fármaco. Luego, se tomó una alícuota de 0.3 ml de cada muestra (Microemulsión Citronella - ACZ - Solución Fisiológica - Polímeros; Microemulsión Citronella - ACZ - Solución Fisiológica; Microemulsión Citronella - ACZ - Agua Bidestilada; Solución Micelar - ACZ - Solución Fisiológica; Solución Fisiológica - Polímeros - ACZ; Agua Bidestilada - ACZ; Solución Fisiológica - ACZ; Aceite de Citronella - ACZ) la cual se diluyó hasta 5 ml en metanol. Posteriormente, de esa solución se tomó una alícuota de 1 ml a los fines de la inyección en el Cromatógrafo.

HPLC: COMPOSICIÓN (% P/P) DE LOS VEHÍCULOS ENSAYADOS

VEHÍCULOS ENSAYADOS PARA LA DETERMINACIÓN DE ACZ (HPLC)	COMPOSICIÓN
MICROEMULSIÓN CITRONELLA - SOLUCIÓN FISIOLÓGICA - POLÍMEROS (PEG 400 - PROPILENGLICOL)	CREMOPHOR EL (2,35%) - BRIJ 35 (2,35%) - TWEEN 80 (4,70%) - ACEITE DE CITRONELLA (2,35%) - SOLUCIÓN FISIOLÓGICA (87,03 %) - PEG 400 (0,70%) - PROPILENGLICOL (0,52%).
MICROEMULSIÓN CITRONELLA - SOLUCIÓN FISIOLÓGICA	CREMOPHOR EL (2,38%) - BRIJ 35 (2,38 %) - TWEEN 80 (4,76%) - ACEITE DE CITRONELLA (2,38 %) - SOLUCIÓN FISIOLÓGICA (88,10%).
MICROEMULSIÓN CITRONELLA - AGUA BIDEDESTILADA	CREMOPHOR EL (2,38%) - BRIJ 35 (2,38 %) - TWEEN 80 (4,76 %) - ACEITE DE CITRONELLA (2,38 %) - AGUA BIDEDESTILADA (88,10 %).
SOLUCIÓN MICELAR - SOLUCIÓN FISIOLÓGICA	CREMOPHOR EL (2,44%) - BRIJ 35 (2,44%) - TWEEN 80 (4,87%) SOLUCIÓN FISIOLÓGICA (90,25%)
SOLUCIÓN FISIOLÓGICA-POLÍMEROS	PEG 400 (0,80 %) - PROPILENGLICOL (0,60%) - 98,60% SOLUCIÓN FISIOLÓGICA

TABLA 2.1: COMPOSICIÓN (% P/P) DE LOS VEHÍCULOS ENSAYADOS (HPLC).

NOTA: SE ENSAYARON TAMBIÉN LAS FASES: EXTERNAS (AGUA BIDEDESTILADA; SOLUCIÓN FISIOLÓGICA) E INTERNA (ACEITE ESENCIAL DE CITRONELLA).

HPLC: RESULTADOS OBTENIDOS

$$y = 2,9330E^{+07}x + 3,3458E^{+04}$$

$$R^2 = 9,9998E^{-01}$$

TABLA 2.2: SOLUBILIDAD DE ACZ EN SOLUCIÓN MICELAR, MICROEMULSIONES DE CITRONELLA Y DIFERENTES FASES DE LA FÓRMULA DISEÑADA (*) EL VALOR DE SOLUBILIDAD DE ACZ EN EL VOLUMEN DE ACEITE CONTENIDO EN LA FÓRMULA ES DE 0,79 ±0,01 MG.

MUESTRAS ENSAYADAS	CONCENTRACIÓN DE ACZ (MG/10 ML DE SUSTANCIA/VEHÍCULO ENSAYADO)
MICROEMULSIÓN CITRONELLA - ACZ - SOLUCIÓN FISIOLÓGICA - POLÍMEROS	37,17 ± 0,21
MICROEMULSIÓN CITRONELLA - ACZ - SOLUCIÓN FISIOLÓGICA	36,00 ± 0,21
MICROEMULSIÓN CITRONELLA - ACZ - AGUA BIDEFILADA	36,17 ± 0,21
SOLUCIÓN MICELAR - ACZ - SOLUCIÓN FISIOLÓGICA	20,67 ± 0,16
AGUA BIDEFILADA - ACZ	6,74 ± 0,16
SOLUCIÓN FISIOLÓGICA - ACZ	6,66 ± 0,16
SOLUCIÓN FISIOLÓGICA-POLÍMEROS - ACZ	6,70 ± 0,16
ACEITE DE CITRONELLA - ACZ	26,32 ± 0,18 (*)

LOS INTERVALOS DE CONFIANZA AL 95% PARA LAS MUESTRAS SE CALCULARON SEGÚN [ESTADÍSTICA Y QUIMIOMETRÍA PARA QUÍMICA ANALÍTICA, MILLER, N. J. & MILLER, J. C. PEARSON EDUCACIÓN, MADRID, 2002.]

Como se puede observar en la Tabla 2.2, la solubilidad de ACZ en la Solución Micelar y en la Microemulsión de Citronella con mayor capacidad de carga, fue de 20,67 mg/10 ml y 37,17 mg/10 ml, respectivamente.

Los sistemas coloidales diseñados lograron incrementar la solubilidad aparente de ACZ respecto de la solubilidad en la solución empleada como fase externa, según se detalla a continuación:

- ✓ 4,5 veces en el caso de la Microemulsión.
- ✓ 2 veces en el caso del Sistema Micelar.

La capacidad de una microemulsión o/w para aumentar la solubilidad del fármaco respecto de la micela equivalente depende tanto de la solubilidad del principio activo en la fase dispersa como de la localización del fármaco en la interfase constituida por los agentes tensioactivos/cotensioactivos. Referido a esto, dado el reducido valor de

solubilidad obtenido para ACZ en el Aceite de Citronella, es probable, el sitio de preferencia del fármaco se encuentre en la interfase de la microemulsión y en el corazón hidrófobo de la Micela. De este modo, se podría atribuir la diferencia de solubilidad entre ambos sistemas a la mayor capacidad de carga del film interfacial respecto del entorno hidrófobo presente en la estructura micelar (*Narang, Delmarre y Gao, 2007*).

RESULTADOS - ENSAYOS *IN-VIVO*

PRUEBAS DE IRRITACIÓN OCULAR: TEST DRAIZE

La prueba ocular Draize “Draize Eye Test” (DET), originalmente pensada en 1944 como prueba destinada a evaluar los efectos potencialmente nocivos de los compuestos químicos en piel, se ha empleado también para predecir el potencial efecto irritante de los productos químicos a nivel ocular (*Secchi y Deligianni, 2006*).

El DET se considera la prueba (protocolo estándar) universalmente aceptada así como el método formalmente aprobado para alcanzar los propósitos anteriormente mencionados.

A lo largo de las últimas décadas, se han propuesto varias versiones con una amplia gama de modificaciones. No obstante, siempre se han conservado los principales lineamientos del protocolo original (*Secchi y Deligianni, 2006*).

El método original consiste en aplicar las sustancias a ser ensayadas en el saco conjuntival inferior de los animales, registrar y puntuar los daños (signos de enrojecimiento, hinchazón, secreción, ulceración o cualquier otro tipo de lesión) en córnea, iris y conjuntiva por hasta 14 días y el día 21 si la recuperación no ocurre antes de dicho período de tiempo.

Generalmente, se prefieren conejos a otros animales de experimentación debido al tamaño ocular (ojos grandes), a que la anatomía y fisiología del globo ocular del conejo ha sido bien estudiada y a la elevada disponibilidad y facilidad de acceso desde el punto de vista económico (*Wilhelmus, 2001*).

Sin embargo, se han surgido algunas críticas referidas al empleo del test, en su mayoría relacionadas a diferencias existentes entre el ojo del conejo y el humano.

Consecuentemente, se estima una sobrevaloración de los efectos nocivos y de los posibles efectos relevantes dado que se ha demostrado que los conejos presentan respuestas irritativas más intensas que el humano (*Lotti, Schmitt y Gautheron, 1984*). En este sentido, el animal puede ser considerado como un modelo hiper-reactivo. Además, se sabe que la superficie epitelial de la córnea humana es mucho menos permeable a soluciones hidrófilas. Asimismo, los conejos presentan una córnea más delgada sin membrana de Bowman.

Por otra parte, existen razones anatómicas y fisiológicas que imposibilitan definir con claridad la relación entre la cantidad administrada de fármaco y la que realmente se encuentra en la superficie ocular del conejo, así como el tiempo real de exposición (*Secchi y Deligianni, 2006*). Entre las razones anatómicas se encuentra la presencia de la membrana nictitante o tercer párpado en el ojo del conejo. Se cree que esta membrana al deslizarse horizontalmente sobre el ojo podría servir de ayuda para la eliminación de sustancias irritantes que se encuentren en contacto con la superficie corneal (*Calabrese, 1983*). También se ha evidenciado que la cinética de eliminación de sustancias a través del tercer párpado en conejo se vuelve impredecible.

El grosor de la córnea y de los componentes estructurales en ambas especies es distinto. La córnea del conejo tiene un grosor aproximado de 0,37 mm mientras que en la córnea humana es de 0,51 mm (*Calabrese, 1983*). Por otro lado, el área de la córnea en relación con la superficie total del globo ocular también varía de manera significativa entre especies. En la especie humana esta relación es del 7%, mientras que en el conejo es del 25% (*Swanston, 1985*). Además, los conejos tienden a secretar una menor cantidad de lágrima y a parpadear en menor medida (*Vinardell y Mitjans, 2008*).

Otras críticas serias al DET incluyen el hecho de que la prueba no da ninguna información útil en los mecanismos implicados en la inducción de toxicidad.

No obstante, aunque las objeciones que se han efectuado tienen cierto grado de significancia, *el DET sigue siendo el ensayo más relevante al momento de evaluar el potencial efecto de agresión a nivel ocular (Secchi y Deligianni, 2006) constituyendo la única prueba formalmente aceptada y validada para valorar la severidad de la irritación (Wilson, Ahearne y Hopkinson, 2015).*

METODOLOGÍA EMPLEADA EN EL LABORATORIO:

La irritación ocular y/o los efectos dañinos de las formulaciones desarrolladas se han comparado con aquellos generados por una solución de Lauril Sulfato de Sodio (LSS) al 2% p/v (control positivo), empleando una versión ligeramente modificada de la prueba de Draize (*Draize et al, 1944; Tártara et al, 2012*).

La principal modificación con respecto al método original es la utilización de un oftalmoscopio binocular indirecto (Neitz® Tokyo Japan) y lupa de aumento de 20 Dioptrías (Nikon® Tokyo, Japan), permitiendo evaluar microlesiones corneales y conjuntivales ayudados con marcadores como la fluoresceína (Solución de Grant®-Laboratorio Alcon®).

En este test se emplearon ciclos de 3 conejos Nueva Zelanda para cada formulación, con un peso promedio entre 2 - 2,5 kg. Se instilaron 50 µl de las formulaciones en estudio (Microemulsión Citronella - Soluc. Fisiológica; Microemulsión Geraniol - Solución Fisiológica; Microemulsión Geranio - Solución Fisiológica) en el saco conjuntival del ojo derecho del conejo. También se colocó Lauril Sulfato de sodio al 2% (SDS 2%) como control positivo. El ojo izquierdo se utilizó como ojo control mediante la instilación de una solución salina (Cloruro de sodio al 0,9%).

Previo y posterior a la exposición se evaluó la córnea, conjuntiva e iris. Se efectuaron exámenes del segmento anterior del ojo, mediante oftalmoscopia binocular con luz blanca y filtro azul, constatando posibles lesiones de la conjuntiva (quemosis, inflamación, exudación, enrojecimiento), del iris y de la córnea (grado de opacidad y superficie afectada). Las lesiones de cada estructura ocular se evaluaron en función del índice de irritación ocular calculado según baremo basado en el Test Draize, presente en Tabla 2.3 (*Draize et al, 1944; Wilhelmus, 2001; Tártara, 2013*).

Las observaciones fueron realizadas a los 30, 60, 120, 240 y 1440 minutos, de acuerdo con una escala de puntajes basada en el Test de Draize véase Tabla 2.3 (*Draize et al, 1944*). En función de lo antes mencionado se pudo clasificar la gravedad de las lesiones oculares según su intensidad ("score"), véase Tabla 2.4.

TABLA 2.3: SCORE TEST DRAIZE (Tártara, 2013)

Córnea	
<i>(A) Grado de densidad de la opacidad</i>	<i>Puntaje</i>
Áreas dispersas o difusas con detalles del iris claramente visible.	1
Áreas traslucidas fácilmente discernibles, detalles del iris claramente visible.	2
Áreas opalescentes, detalles del iris no visible, tamaño de la pupila apenas discernible.	3
Opacidad, iris invisible.	4
<i>(B) Área de la córnea involucrada</i>	
Un cuarto (o menos) pero no cero.	1
Mayor a un cuarto y menos que un medio	2
Mayor que un medio y menos que tres cuartos .	3
Mayor que tres cuartos hasta toda el área.	4
Puntaje: A x B x 5. (puntaje máximo 80)	
Iris	
<i>(A) Valores</i>	
Pliegues superior a lo normal, congestión, inflamación, inyección ciliar (Alguno, todos o combinación de estos).	1
No reacción a la luz, hemorragia, destrucción severa	2
Puntaje: A x 5. (Puntaje máximo: 10)	
Conjuntiva	
<i>(A) Enrojecimiento (referido solamente a la conjuntiva palpebral)</i>	
Vasos definitivamente inyectados superior a lo normal.	1
Más difuso, rojo carmesi profundo, vasos individuales no fácilmente discernibles.	2
Rojo fuerte difuso	3
<i>(B) Quemosis</i>	
Cualquier inflamación superior a lo normal (incluyendo la membrana nictitante)	1
Inflamación obvia con parcial eversión de los párpados .	2
Inflamación con párpados entrecerrados.	3
Inflamación con párpados entrecerrados a completamente cerrados.	4
<i>(C) Secreciones</i>	
Cualquier cantidad diferente de la normal	1
Secreciones con humectación de los párpados y pelos adyacentes a los párpados.	2
Secreciones con humectación de los párpados y un área considerable alrededor de los ojos .	3
Puntaje: (A + B + C) x 2 (Puntaje máximo: 20)	

TABLA 2.4: VALORACIÓN DE INTENSIDAD DE IRRITACIÓN SEGÚN SCORE OBTENIDO TRAS APLICACIÓN DEL TEST DRAIZE (*Tártara, 2013*)

SCORE	EFECTOS DE LA FORMULACIÓN
0 - 8	AUSENCIA DE IRRITACIÓN
9 - 20	IRRITACIÓN LEVE
21 - 40	IRRITACIÓN LEVE MODERADA
41 - 60	IRRITACIÓN MODERADA
61 - 80	DAÑO SEVERO
81 - 110	DAÑO MUY SEVERO

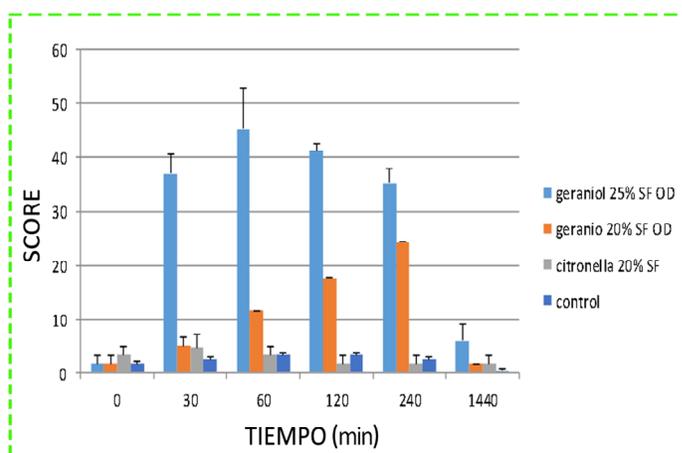
En la Tabla 2.5 presentada a continuación se detalla la composición de cada una de las muestras sujetas al ensayo de irritación ocular (Draize Test).

TABLA 2.5: COMPOSICIÓN DE LAS MICROEMULSIONES ENSAYADAS EN EL TEST DRAIZE.

MUESTRAS DESTINADAS A ENSAYOS DE IRRITACIÓN	COMPOSICIÓN: % (P/P)
MICROEMULSIÓN GERANIO - SOLUCIÓN FISIOLÓGICA	CREMOPHOR EL (2,38%) - BRIJ 35 (2,38 %) - TWEEN 80 (4,76 %) - ACEITE DE GERANIO (2,38 %) - SOLUCIÓN FISIOLÓGICA (88,10 %).
MICROEMULSIÓN GERANIOL - SOLUCIÓN FISIOLÓGICA	CREMOPHOR EL (2,20 %) - BRIJ 35 (2,20 %) - TWEEN 80 (4,49 %) GERANIOL (3 %) - SOLUCIÓN FISIOLÓGICA (88,11 %).
MICROEMULSIÓN CITRONELLA - SOLUCIÓN FISIOLÓGICA	CREMOPHOR EL (2,38%) - BRIJ 35 (2,38 %) - TWEEN 80 (4,76 %) - ACEITE DE CITRONELLA (2,38 %) - SOLUCIÓN FISIOLÓGICA (88,10 %).

ENSAYO DE IRRITACIÓN OCULAR: GRÁFICO - SCORE (LESIÓN OCULAR) VS TIEMPO.

FIGURA 2.7: GRÁFICO-SCORE DE IRRITACIÓN VS TIEMPO (MIN).
NOTA: LOS PORCENTAJES MENCIONADOS EN EL GRÁFICO CORRESPONDEN A LA CANTIDAD PORCENTUAL DE GERANIOL, CITRONELLA Y GERANIO PRESENTE EN LA MEZCLA INICIAL ACEITE/SURFACTANTES, PREVIO A LA ADICIÓN DE LA FASE EXTERNA.



En la Figura 2.7 se puede observar que en todos los casos, la intensidad de la irritación fue dependiente del tiempo. Para la microemulsión Geraniol-Solución

Fisiológica, se observa un efecto irritante moderado que supera al efecto generado por la microemulsión Geranio-Solución Fisiológica para la cual el nivel de agresión se clasificó como “leve a moderado”.

Por otro lado, a diferencia de los sistemas de Geranio y Geraniol, la microemulsión de Citronella presentó ausencia de irritación durante el período de examinación, lo que motivó su selección para las pruebas en animales de experimentación.

MEDICIÓN DE PIO

Instrumento de medición empleado: TONOVET.

PRINCIPIOS DE MEDICIÓN DE PIO: TONOMETRÍA POR REBOTE

La figura 2.8 representa el método de medición de PIO a través de tonometría por rebote, desarrollado por Dekking y Coster en 1967.

El tonómetro de rebote consta de una estructura con dos muelles coaxiales que impulsan una sonda magnetizada hacia la córnea y detectan la deceleración de la misma producida por el contacto ocular. Esta velocidad de deceleración se relaciona con la PIO (*Kontiola et al, 2001*).

Si la PIO es elevada, la sonda decelera rápidamente acortándose el tiempo de impacto en córnea. En base a estos parámetros operativos (velocidad de la sonda y tiempo de contacto corneal) se determina de modo indirecto la presión intraocular.

Para la realización de las mediciones no debe utilizarse anestesia local; su uso distorsionaría la lectura (*Badouin y Gastaud, 1994*). De todos modos, en la mayoría de los animales, la medición mediante tonometría por rebote no causa siquiera reflejo corneal.

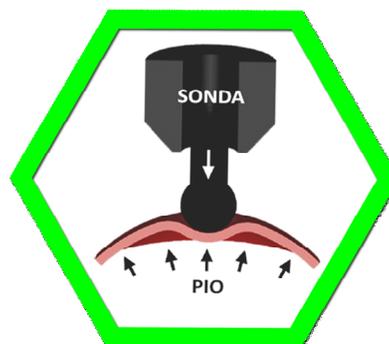


FIGURA 2.8: PRINCIPIOS BÁSICOS DEL FUNCIONAMIENTO DE MEDICIÓN DE PIO MEDIANTE TONOMETRÍA POR REBOTE.

ENSAYOS DE EFICACIA HIPOTENSORA *IN VIVO*: DETERMINACIÓN DE LA PIO

En este experimento se han utilizado 6 conejos normotensos neozelandeses, machos de 2 - 2,5 kg de peso cada uno. Los ensayos se realizaron atendiendo a los procedimientos de manejo animal basados en la resolución sobre el uso de animales en investigación, establecidos por la Asociación para la Investigación en Visión y Oftalmología (ARVO), la Directiva del Consejo de Comunidades Europeas (86/609/CEE) y el Comité institucional de atención y utilización de los animales de investigación, de la Facultad de Química de la Universidad Nacional de Córdoba (Argentina), habiéndose cumplido exhaustivamente todos los protocolos.

Los conejos se mantuvieron en jaulas individuales, teniendo libre acceso a alimentos y agua, y bajo un ciclo controlado 12 h de luz/12 h oscuridad.

Las formulaciones se aplicaron en los 6 conejos (n = 12 ojos). La PIO se midió con un tonómetro de rebote (Tonovet, Tiolat, Helsinki, Finlandia), técnica tópica que no requiere anestesia.

Para cada ojo, se fijó un valor de PIO del 100% con tres lecturas basales tomadas 30 minutos antes de la instilación. A continuación, se aplicó una dosis de la formulación (50 µL) en cada uno de los ojos. Se realizaron determinaciones de la PIO una vez, cada hora y durante las siguientes 10 horas.

Los experimentos se llevaron a cabo siempre en el mismo momento del día.

En la prueba de controles, los conejos recibieron formulaciones sin el agente hipotensor (Solución Ringer Lactato). El protocolo de administración incluyó, al menos, un período de lavado de 24 h entre experimentos.

Los sistemas ensayados se detallan a continuación:

- Microemulsión Citronella ACZ - TM - Solución Fisiológica
- Microemulsión Citronella ACZ - TM - Solución Fisiológica Polietilenglicol 400 0,8% - Propilenglicol 0,6% (estos valores corresponden a la concentración de polímeros en la fase externa (solución fisiológica) añadida a la mezcla aceite/surfactantes. La concentración de los mismos en la microemulsión ensayada es de 0,69% y 0,52% (P/P) respectivamente), véase Figura 2.9.
- Solución comercial de Timolol Maleato (Proflax 0,5%; 0,5% TM Base)

- Suspensión comercial AZARGA (Brinzolamida 1% - 0,5% TM Base como TM Maleato)
- Solución Ringer Lactato.

En todos estos casos se instiló, en ambos ojos, la misma dosis.

Procedimiento de medición de PIO en animales de experimentación



Para facilitar la manipulación al momento de instilar la fórmula, el animal se coloca sobre una caja situada en la mesada de trabajo.



Se instila en cada ojo del animal una gota (50 microlitros perfectamente medidos con micropipeta de la fórmula a ensayar).



Se toma el tonómetro con una mano y con la otra se abren con suavidad los párpados del animal presionando el botón de medición. El extremo de la sonda debe hacer contacto con la córnea central (la PIO debe medirse siempre en la córnea central para obtener el valor real, dado que el resultado variará en las distintas partes del ojo).



Se requieren seis mediciones individuales para lograr un resultado final exacto. Los valores mostrados durante la medición representan los valores medios de las mediciones anteriores (1-5), no a los valores de medición individuales. Tras cada medición individual realizada con éxito, se escucha un tono breve. Una vez realizadas las seis mediciones, se escucha un tono más largo mostrándose en pantalla el resultado final.

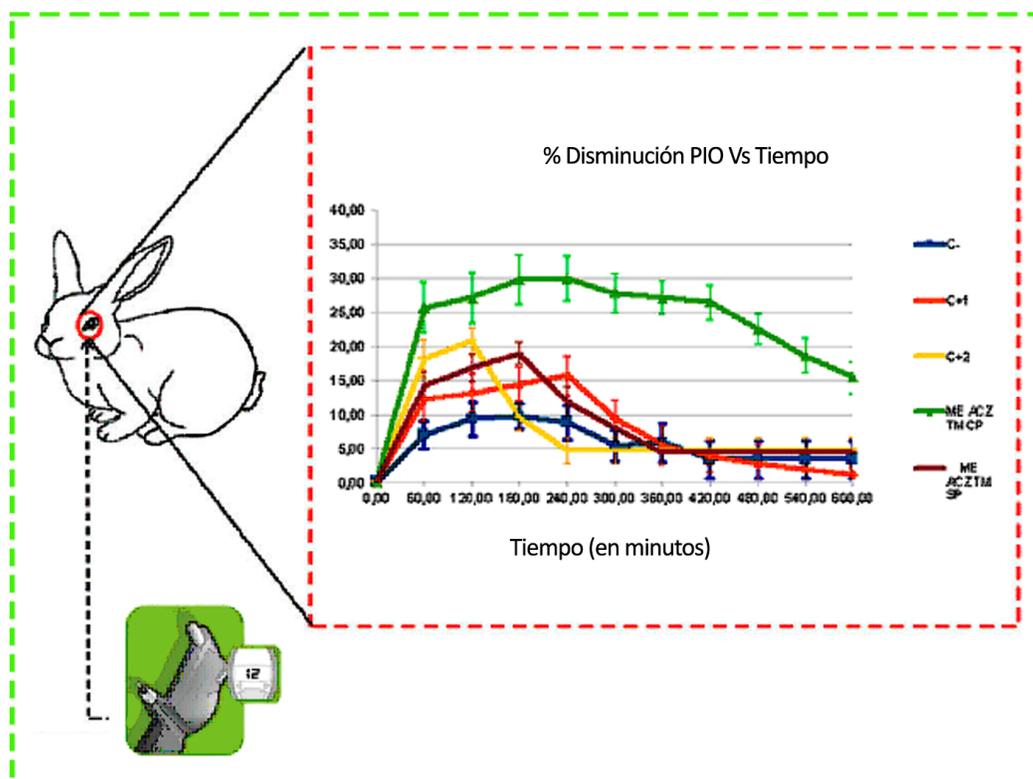


FIGURA 2.9: GRÁFICO % DESCENSO DE PIO VS TIEMPO (MIN). Muestras ensayadas (% P/P):

- CONTROL NEGATIVO (C -): Solución Ringer Lactato.
- CONTROL POSITIVO I (C+1): Solución de Timolol comercial (Proflax 0,5% - 0,5 % TM base).
- CONTROL POSITIVO II (C+2): Suspensión comercial Brinzolamida-Timolol (Azarga: 1 % Brinzolamida - 0,5 % de Timolol base como Timolol Maleato).
- MICROEMULSIÓN ACZ TM CON POLÍMEROS: ME ACZ TM CP (Cremophor EI - 2,33 %; Brij 35 - 2,33 %; Tween 80 - 4,66%; Aceite de Citronella - 2,33%; ACZ - 0,26 %; TM Maleato - 0,59 % (equivalente a 0,43% TM base); Propilenglicol - 0,52 %; PEG 400 - 0,69%; Solución Fisiológica - 86,29 %).
- MICROEMULSIÓN ACZ TM SIN POLÍMEROS: ME ACZ TM SP (Cremophor EI - 2,36 %; Brij 35 - 2,36 %; Tween 80 - 4,72 %; Aceite de Citronella: 2,36%; ACZ - 0,26; TM Maleato 0,59 % (equivalente a 0,43% TM base) Solución Fisiológica - 87,35%).

TABLA 2.6: CUADRO COMPARATIVO: MICROEMULSIONES DE CITRONELLA - FÓRMULAS COMERCIALES (% DE MÁXIMO DESCENSO, TIEMPO AL QUE SE ALCANZÓ EL MÁXIMO % DE DESCENSO (T.MAX), ÁREA BAJO LA CURVA (AUC).

% DE MÁXIMO DESCENSO	ERROR	T. MAX (min)	AUC_(0-10)	AUC_ERROR	FORMULACIONES
9,69	2,76	180	62,66	19,26	C-
15,74	1,06	240	79,84	6,17	C+1
20,90	1,95	120	79,77	16,14	C+2
29,95	2,39	240	243,19	25,84	ME ACZ TM CP
19,01	1,64	180	89,78	12,75	ME ACZ TM SP

ANÁLISIS ESTADÍSTICO: DESCRIPCIÓN DEL ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS DATOS DE PRESIÓN INTRA-OCULAR (PIO) EN CONEJOS NORMOTENSOS

Datos analizados: consisten en una serie de tiempo de las mediciones de PIO para los dos ojos de 6 conejos normotensos a intervalos regulares de 60 minutos.

PRE-PROCESAMIENTO DE DATOS

Se completaron los datos faltantes para uniformar las series en intervalos y cantidad de observaciones.

C (-) se extendieron las observaciones las ultimas 3 hs (Last observation carried forward (LOCF)) lo cual resulta razonable por haberse considerado el alcance del nivel basal.

C (+1) interpolación lineal en 180, 300, y 420.

ME ACZ TM CP Interpolación lineal en 360 y 480

ME ACZ TM SP Interpolación lineal en 300 y LOCF para 420 en adelante.

Procesamiento:

Se realizaron dos tipos de estudio a los datos:

1 – Cálculo del descenso porcentual de PIO para cada tratamiento con sus respectivas desviaciones y errores estándares. Asimismo, se determinaron algunos parámetros farmacológicos tal es el caso del cálculo del área bajo la curva AUC-[0,10] como una medida de biodisponibilidad del fármaco en el sitio de acción. También, el máximo % descenso obtenido y el tiempo al que fue alcanzado.

2 - Análisis de igualdad de medias para muestras dependientes (test t para medias apareadas) ya que en los datos se compara el mismo ojo para las diferentes fórmulas a fin de determinar si los promedios de descenso de PIO son estadísticamente significativos en los distintos instantes de medición.

Todos los valores de p menores a 0,05 indican que existe diferencia en el descenso promedio entre los tratamientos correspondientes en el tiempo estudiado.

SOFTWARE UTILIZADO

Se utilizó para los cálculos una hoja excel y el comando `ttest_rel` del módulo `scipy.stats` de Python.

El análisis estadístico de los datos se efectuó con la colaboración del Dr. Jose Bavio-Departamento de Matemática - Universidad Nacional del Sur (UNS).

ENSAYOS *IN-VIVO*: MEDICIÓN DE PIO- RESULTADOS

El máximo de reducción de la PIO generado por la ME ACZ TM CP, se observa tras 4 h de haber sido administrada la fórmula. En este punto, se puede evidenciar para la formulación mencionada, diferencias de disminución de presión significativamente superiores a los valores obtenidos por la ME ACZ TM SP y las fórmulas comerciales, véase Figura 2.9.

Por otro lado, la fórmula Brinzolamida-Timolol, alcanzó su máximo efecto a las 2 h; a ese tiempo, la formulación ME ACZ TM CP arroja valores de disminución de PIO significativamente superiores, aun no habiendo alcanzado su máximo efecto.

Asimismo, de los perfiles terapéuticos se desprende que el área bajo la curva de las fórmulas comerciales, suspensión Brinzolamida-Timolol y solución de Timolol, fue 3 veces menor al de la ME ACZ TM CP, véase Tabla 2.6, habiéndose empleado incluso una dosis algo menor de beta-adrenérgico en las microemulsiones ensayadas y una concentración de ACZ en la ME ACZ TM CP aproximadamente 4 veces inferior a la del análogo presente en la fórmula comercial, véase Figura 2.9.

Por lo anteriormente expuesto, se puede concluir, que la ME ACZ TM CP logró una reducción de PIO más marcada y sostenida en el tiempo (superior a 7 h) comparado con las fórmulas comerciales y con la ME ACZ TM SP.

Referido a las diferencias entre las microemulsiones ensayadas, dado la similitud en la composición, se puede sugerir que la mejora en el perfil de liberación y biodisponibilidad se debe a la adición de polímeros en fase externa; es probable, estos compuestos actúen como co-surfactantes modificando propiedades de la interfase, aumentando la estabilidad del sistema y potenciando las propiedades de liberación sostenida de fármacos, atribuibles a las microemulsiones.

CONCLUSIÓN

La microemulsión basada en aceite de Citronella, Brij 35, Cremophor El, Tween 80 ACZ, TM y Polímeros, ha demostrado estabilidad termodinámica, propiedades fisicoquímicas aceptables, capacidad para vehicular cantidades considerables de fármacos de diferente polaridad así como propiedades de liberación sostenida promoviendo todo esto un aumento marcado en la biodisponibilidad.

Como pudo apreciarse en los ensayos, el sistema ME ACZ TM CP mejora la performance del colirio comercial aumentando el pico de descenso con una prolongación del efecto durante 7 h.

Asimismo, teniendo en cuenta las características de los fármacos utilizados como modelos, podemos concluir que la microemulsión de citronella mejora marcadamente la eficiencia, pudiendo ser considerada como una interesante estrategia para la vehiculización de fármacos de uso oftalmológico al permitir la combinación simultánea de moléculas hidrófobas e hidrófilas en una misma fórmula.

Sumado a esto, teniendo en cuenta que la microemulsión tiene una fase externa acuosa, el uso de polímeros bioadhesivos en fase externa puede ser considerado como una alternativa a futuro para prolongar aún más el tiempo de contacto de los sistemas sobre la superficie ocular.

A su vez como perspectivas a estos estudios podemos citar las siguientes:

- 1-** evaluar un set de polímeros mucoadhesivos y el efecto obtenido tras aumentar los polímeros sintéticos incorporados a la fórmula diseñada en la fase externa.
- 2-** evaluar el efecto de la osmolaridad sobre los sistemas y sobre la capacidad de carga al aumentar el porcentaje de la fase interna.
- 3-** ensayar otro tipo de fármacos tanto para Glaucoma como para otras patologías oculares.

Finalmente, se puede concluir que el aporte central de esta sección de la Tesis Doctoral se basó en la obtención de un sistema nanométrico del tipo microemulsión, no irritante que permitiese potencialmente vehicular tanto fármacos hidrófilos como hidrofóbicos de uso ocular. Todos estos resultados permitieron construir una hipótesis posterior pero sostenida en las bondades antes descriptas.

BIBLIOGRAFÍA

Aiache, J. M., Meski, S., Beyssac, E y Serpin, G. (1997). The formulation of drug for ocular administration. *Journal of Biomaterials Applications*, 11(8), pp: 329-348.

Altafini, R., Scherzer, M. L., Hubatsch, D y Frezzotti, P. (2015). Brinzolamide 1%/timolol versus dorzolamide 2%/timolol in the treatment of open-angle glaucoma or ocular hypertension: prospective randomized patient-preference study. *Clinical Ophthalmology*, 1(9), pp: 2263-2270.

Ammar, H. O., Salama, H. A., Ghorab, M y Mahmoud, A. A. (2009). Nanoemulsion as a Potential Ophthalmic Delivery System for Dorzolamide Hydrochloride. *American Association of Pharmaceutical Scientists Pharmaceutical Science and Technology*, 10 (3), pp: 808-819.

Andrew, N. H., Franzco, S. A y Casson R. J. (2020). A review of aqueous outflow resistance and its relevance to microinvasive glaucoma surgery. *Survey of Ophthalmology*, 65(1), pp: 18-31.

Bachu, R. D., Chowdhury, P., Al-Saedi Z. H. F., Karla, P. K y Boddu, S. H. S. (2018). Ocular drug delivery barriers—role of nanocarriers in the treatment of anterior segment ocular diseases. *Pharmaceutics*, 10(1), pp: 3-31.

Badouin, C y Gastaud, P. (1994). Influence of topical anesthesia on tonometric values of intraocular pressure. *Ophthalmologica*, 208(6), pp: 309-313.

Berman, E. R (ed). Tears. (1991). En: *Biochemistry of the eye. Perspective in Vision Research*, pp: 63-88. Springer Science, USA.

Berson, F. G y Epstein, D. L. (1981). Separate and combined effects of timolol maleate and acetazolamide in open-angle glaucoma. *American Journal of Ophthalmology*, 92(6), pp: 788-791.

Berthod, A., Carda-Broch, S y Garcia-Alvarez-Coque, M. C. (1999). Hydrophobicity of ionizable compounds. A theoretical study and measurements of diuretic octanol-water partition coefficients by countercurrent chromatography. *Analytical Chemistry*, 71(4), pp: 879-888.

Bisht, R., Mandal, A., Jaiswal, J. K y Rupenthal, I. D. (2018). Nanocarrier mediated retinal drug delivery: overcoming ocular barriers to treat posterior eye diseases. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology*, 10(2), pp: 1-21.

Burgalassi, S., Patrizia, C., Monti, D y Fabrizio Saettone, M. (2001). Cytotoxicity of potential ocular permeation enhancers evaluated on rabbit and human corneal epithelial cell lines. *Toxicology Letters*, 122(1), pp: 21-28.

- Calabrese, E. J. (1983). Dermatotoxicity: Predictive Model. En: *Principles of animal extrapolation*, pp: 391- 424. Wiley Interscience, USA.
- Caprioli, J y Coleman, A. L. (2008). Intraocular pressure fluctuation. A risk factor for visual field progression at low intraocular pressure in the advanced glaucoma intervention study. *Ophthalmology*, 115(7), pp: 1123-1129.
- Carreon, T., Van der Merwe, E., Fellman, R. L., Johnstone, M y Bhattacharya, S. K. (2017). Aqueous outflow - A continuum from trabecular meshwork to episcleral. *Progress in Retinal and Eye Research*, 57(26), pp: 108-133.
- Chavda, V. P y Shah, D. (2017). Self-emulsifying delivery systems: one step ahead in improving solubility of poorly soluble drugs. En: Grumezescu, A. M y Fikai, A (eds). *Nanostructures for Cancer Therapy*, pp: 653-718. Elsevier, Países bajos.
- Chen, Y., Jiang, K., Wei, G y Dai, Y. (2019). Medical Treatment Strategy for Glaucoma. En: Sun, X y Dai, Y. (eds.). *Medical Treatment of Glaucoma*, pp: 87-113. Springer Nature, Signapore.
- Cholkar, K., Dasari, S., Pal, D y Mitra, A. (2013). Eye: Anatomy, physiology and barriers to drug delivery. En: Mitra, A. K (Ed). *Ocular Transporters and Receptors: Their Role in Drug Delivery*, pp: 1-36. Woodhead Publishing, UK.
- Cunha-Vaz, J., Marques, F. B., Fernandes, R., Alves, C y Velpandian, T. (2016). Drug transport across blood-ocular barriers and pharmacokinetics. En: Velpandian, T (ed). *Pharmacology of Ocular Therapeutics*, pp: 37-63. ADIS, Springer International Publishing AG, Suiza.
- Del Monte, D. W y Kim, T. (2011). Anatomy and physiology of the cornea. *Journal of Cataract & Refractive Surgery*, 37(3), pp: 588-598.
- Doménech, J., Martínez, J y Péraire, C. (2013). Tratado general de Biofarmacia y Farmacocinética. Síntesis, España.
- Draize, J. H., Woodard, G y Calvery, H. O. (1944). Methods for the study of irritation and toxicity of substances applied topically to the skin and mucous membranes. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 82(3), pp: 377-390.
- Dunn, F. G y Frohlich, E. D. (1981). Pharmacokinetics, mechanisms of action, indications, and adverse effects of timolol maleate, a nonselective beta-adrenoreceptor blocking agent. *Pharmacotherapy*, 1(3), pp: 188-200.
- El-Gazayerly, O. N y Hikal, A. H. (1997). Preparation and evaluation of acetazolamide liposomes as an ocular delivery system. *International Journal of Pharmaceutics*, 158(2), pp: 121-127.
- Foster, P. J., Buhrmann, R., Quigley, H. A y Johnson, G. J. (2002). The definition and

classification of glaucoma in prevalence surveys. *British Journal of Ophthalmology*, 86 (2), pp: 238-242.

Gaudana, R., Jwala, J., Boddu, S. H. S y Mitra, A. K. (2008). Recent Perspectives in Ocular Drug Delivery. *Pharmaceutical Research*, 26(5), pp: 1197-1216.

Gipson, I. K (1994). Anatomy of the Cornea and limbus, Anatomy of the conjunctiva, cornea and limbus. En: Simolin, G y Thoft, R. A (eds). *The Cornea*, pp: 3-24. Little Brown, USA.

Gipson, I. K., Hori, Y y Argüeso, P. (2004). Character of ocular surface mucins and their alteration in dry eye disease. *The Ocular Surface*, 2(2), pp: 131-148.

Gooch, N., Sarah, A., Molokhia, S. A., Condie, R., Burr, R. M, Archer, B., Ambati, B. K y Wirostko, B. (2012). Ocular drug delivery for glaucoma management. *Pharmaceutics*, 4 (1), pp: 197-211.

Haße, A y Keipert, S. (1997). Development and characterization of microemulsions for ocular application. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 43(2), pp: 179-183.

Hollo, G. (2015). Carbonic anhydrase inhibitors. En: Shaarawy, T. M., Sherwood, M. B., Hitchings, R. A y Crowston, J. G.(eds). *Glaucoma – Medical Diagnosis and Therapy*, pp: 559-565. Elsevier, Saunders.

Hosoya, K. I., Lee, V. H. L. y Kim, K. J. (2005). Roles of the conjunctiva in ocular drug delivery: A review of conjunctival transport mechanisms and their regulation. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 60(2), pp: 227-240.

Hughes, P., Olejnik, O., Changlin, J y Wilson, C. (2005). Topical and systemic drug delivery to the posterior segments. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 57(14), pp: 2010-2032.

Kaufman, P. L y Rasmussen, C. A. (2012). Advances in Glaucoma Treatment and Management: Outflow Drugs. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 53(5), pp: 2495-2500.

Kaur, I. P., Singh, M y Kanwar, M. (2000). Formulation and evaluation of ophthalmic preparations of acetazolamide. *International Journal of Pharmaceutics*, 199(2), pp: 119-127.

Kaur, I. P, Smitha, R., Aggarwal, D y Kapil, M. (2002). Acetazolamide: Future perspective in topical glaucoma therapeutics. *International Journal of Pharmaceutics*, 248(1-2), pp: 1-14.

Khurana, V., Kwatra, D., Agrahari, V y Mitra, A. K. (2014). Recent advances in ocular drug delivery. En: Mitra, A. K., Lee, C. H y Cheng, K (eds). *Advanced Drug delivery*, pp: 365-381. John Wiley and Sons, Inc. Hoboken, New Jersey.

Kim, Y. C., Chiang, B., Wu, X y Prausnitz, M. R. (2014). Ocular delivery of macromolecules. *Journal of Controlled Release*, 190, pp: 172-181.

Kontiola, A. I., Goldblum, D., Mittag, T y Danias, J. (2001). The Induction/Impact Tonometer: a new instrument to measure intraocular pressure in the rat. *Experimental Eye Research*, 73(6), pp: 781-785.

Le Boulrais, C., Acar, L., Zia, H., Sado, P. A., Needham, T., y Leverage, R. (1998). Ophthalmic drug delivery systems. Recent advances. *Progress in Retinal and Eye Research*, 17(1), pp: 33-58.

Lehmann-Horn, F., Rüdell, R y Jurkat, R. K. (2004). How to avoid side effects of acetazolamide (en Capítulo 46: Nondystrophic myotonias and periodic paralyses). En: Engel, A. G, Franzini-Armstrong, C (ed.). *Myology*, pp: 1257-1300. Mc Graw-Hill, USA.

Liebovitch, L.S. (2006). Why the eye is round?. En: *Advances in Organ Biology. The biology of the eye*, pp: 01-20, Elsevier, USA.

Loftsson, T., Friðriksdóttir, H., Thórisdóttir, S., Stefánsson, E., Sigurðardóttir, A. M y Guðmundsson, O. (1994). 2-Hydroxypropyl-β-Cyclodextrin in Topical Carbonic Anhydrase Inhibitor Formulations. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 1(4), pp: 175-180.

Lotti, V. J., Schmitt, C. J y Gautheron, P. D. (1984). Topical ocular hypotensive activity and ocular penetration of dichlorphenamide sodium in rabbits. *Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology*, 222(1), pp: 13-19.

Ludwig, A y Reimann, H. (2015). Eye. En: Bouwman-Boer, Y., Fenton May, V y Le Brun, P (eds). *Practical Pharmaceutics: An international Guideline for the preparation, care and use of medicinal products*, pp: 163-188. Springer International Publishing, Suiza.

Mandal, A., Bisht, R., Rupenthal, I. D y Mitra, A. K. (2017). Polymeric micelles for ocular drug delivery: From structural frameworks to recent preclinical studies. *Journal of Controlled Release*, 248, pp: 96-116.

Manoharam, C., Basakar, A y Singh, J. (2010). Various Pharmaceutical Disperse Systems. En: Alok, K., Kulshreshtha, O. N y Onkar, N. S (eds). *Pharmaceutical Suspensions: From Formulations Development to Manufacturing*, pp: 1-38. Springer, USA.

Mazyed, E. A y Abdelaziz, E. (2020). Fabrication of transgelosomes for enhancing the ocular delivery of acetazolamide: statistical optimization, in vitro characterization, and in vivo study. *Pharmaceutics*, 12(465), pp: 01-32.

- Michaud, J. E y Friren, B. (2001). Comparison of Topical Brinzolamide 1 % and Dorzolamide 2 % Eye Drops Given Twice Daily in Addition to Timolol 0.5 % in Patients With Primary Open-angle Glaucoma or Ocular Hypertension. *Ophthalmology*, pp: 235-243.
- Miller, N. J y Miller, J. C (2002). Estadística y Quimiometría para Química Analítica, Pearson Educación, España.
- Miñana-Perez, M., Graciaa, A., Lachaise, J y Salager, J. L. (1995). Solubilization of polar oils with extended surfactants. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 100, pp: 217-224.
- Mitra, A. K., Anand, B. S y Duvvuri, S. (2006). Drug Delivery to the eye. En: Fischbarg, J y Bittar, E. E (eds). *Advances in Organ Biology. The anatomy of the eye*, pp: 307-352, Elsevier, USA.
- Narang, A. S., Delmarre, A. S y Gaoc, D. (2007). Stable drug encapsulation in micelles and microemulsions. *International Journal of Pharmaceutics*, 345(1-2), pp: 9-25.
- Nettey, H., Darko, Y., Bamiro, O. A y Addo, R. T. (2016). Ocular Barriers. En: Addo, R. T (ed). *Ocular Drug Delivery: Advances, Challenges and Applications*, pp: 27-36. Springer, Suiza.
- Nicolaides, N., Kaitaranta, J. K., Rawdah, T. N., Macy, J. I., Boswell, F. M y Smith, R. E. (1981). Meibomian gland studies. Comparison of steer and human lipids. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 20(4), pp: 522-536.
- Occhiutto, M. L., Freitas, F. R., Maranhao, R. C y Costa, V. P. (2012). Breakdown of the Blood-Ocular Barrier as a Strategy for the Systemic Use of Nanosystems. *Pharmaceutics*, 4(2), pp: 252-275.
- Parasrampur, J. (1998). Acetazolamide. En: Brittain, H. G y Florey, K (eds). *Analytical Profiles of Drug Substances and Excipients*, pp: 01-32. Academic Press, USA.
- Peng, C. C., Bengani, L. C., Jung, H. J., Leclerc, J., Gupta, C y Chauhan, A. (2011). Emulsions and microemulsions for ocular drug delivery. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 21(1), pp: 111-121.
- Preethi, S., Kaushik, K y Chanky, S. (2015). Microemulsion-a versatile Dimension of Novel Drug Delivery System. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 5(1), pp: 21-31.
- Raghva, S., Hammond, M y Compella, U. V. (2004). Periocular routes for retinal drug delivery. *Expert Opinion on Drug Delivery*, 1(1), pp: 99-114.
- Reolini, T y De Vience, E. (2020). The history of glaucoma medications. En: Leffler, C. T (ed). *The History of Glaucoma*, pp: 475-481. Wayenborg Publications, Países Bajos.

Rogers, K (ed). (2011). Anatomy of the eye. En: *The eye physiology of human perception (The Human Body)*, pp: 17-49. Britanica Educational Publishing y Rosen Educational Services, LLC, USA.

Rupenthal, I. D y Alany, R. G. (2008). Ocular drug delivery. En: Gad, S. (ed). *Pharmaceutical Manufacturing Handbook: Production and Processes*, pp: 729-767. John Wiley & Sons, Inc, USA.

Sall, K y The Brinzolamide Primary Therapystudy Group. (2000). The Efficacy and Safety of Brinzolamide 1% Ophthalmic Suspension (Azopt®) as a Primary Therapy in Patients With Open-Angle Glaucoma or Ocular Hypertension. *Survey of Ophthalmology*, 44(2), pp: S155-S162.

Sapra, K., Sapra, A., Singh, S. K y Kakkar, S. (2012). Self Emulsifying Drug Delivery System: A Tool in Solubility Enhancement of Poorly Soluble Drugs. *Indo Global Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2(3), pp: 313-332.

Secchi, A y Deligianni, V. (2006). Ocular toxicology: the Draize eye test. *Current Opinion in Allergy Clinical Immunology*, 6(5), pp: 367-372.

Shahidullah, M., Al-Maki, W y Delamere, N. A. (2011). Mechanism of aqueous humor secretion and relevance to glaucoma. En: Rumelt, S (ed). *Glaucoma – Basic and Clinical Concepts*, pp: 03-32. Intech, Croacia.

Sheardown, H y Saltzman, W. (2006). Novel Drug Delivery Systems for Posterior segment Ocular Disease. En: Trombrain-Tink, J y Barnstable, C. J (eds). *Ocular Angiogenesis: Diseases, Mechanisms and therapeutics*, pp: 393-408. Humana Press, Inc. Totowa, N J.

Swanston, D. W, 1985. Assessment of the validity of animal techniques in eye-irritating testing. *Food and Chemical Toxicology*, 23(2), pp: 169-173.

Tártara, I. (2013). Efecto del Sistema Portador sobre la Biodisponibilidad Intraocular de Fármacos. Tesis Doctoral. U.N.C, Argentina.

Tártara, I., Quinteros, D., Saino, V., Allemandi, D. A y Palma, S. D. (2012). Improvement of Acetazolamide Ocular Permeation Using Ascorbyl Laurate Nanostructures as Drug Delivery System. *Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics*, 28(2), pp: 102-109.

Tekade, R. K., Maheshwari, R., Soni, N., Tekade, M y Chougule, M. B. (2017). Nanotechnology for Development of Nanomedicine. En: Mishra, V., Kesharwani, P., Iqbal, M. C e Iyer, A (eds). *Nanotechnology Based Aproaches for Targeting and Delivery of Drugs and Genes*, pp: 03-61. Elsevier Inc, UK.

Tiirkytlmaz, A., Celebi, N., Gbniif, B y Alkan-bnyiksel, H. (1998). Physical characterization and stability of a microemulsion for potential oral administration of a peptide. En: Atila Htnca, A y Siiheyla KaŞ, H (eds). *Biomedical Science and Technology Recent*

Developments in the Pharmaceutical and Medical Sciences, pp: 65-72. Springer Science+Business Media, LLC, USA.

Van Der Bijl, P., Van Eyk, A. D y Meyer, D. (2001). Effects of three penetration enhancers on transcorneal permeation of cyclosporine. *Cornea*, 20(5), pp: 505-508.

Van Ooteghem, M. M. M. (1993). Formulation of ophthalmic solutions and suspensions. Problems and Advantages. En: Edman, P (ed). *Biopharmaceutics of Ocular Drug Delivery*, pp: 27-42. CRC Press , USA.

Vinardell, M. P y Mitjans, M. (2008). Alternative Methods for Eye and Skin Irritation Tests: An Overview. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 97(1), pp: 46-59.

Wilhelmus, K. R. (2001).The Draize Eye Test. *Survey Of Ophthalmology*, 45(6), pp: 493-515.

Wilson, C. G., Semenova, E. M., Hughes, P. M y Olejnick, O. (2007). Eye Structure and Physiological Functions. En: Touitou, E y Barry, B. W (eds). *Enhancement in Drug Delivery*, pp: 473-487. CRC Press, USA.

Wilson, S. L., Ahearne, M y Hopkinson, A. (2015). An overview of current techniques for ocular toxicity testing. *Toxicology*, 327, pp: 32-46.

Yadav, D., Varma, L. T y Yadav, K. (2018). Drug delivery to the posterior segment of the eye: conventional delivery, strategies, their barriers and restrictions. En: Patel, J. K., Sutariya, V., Kanwar, J. R y Pathac, Y. V (eds). *Drug delivery for the retina and posterior segment*, pp: 51-67. Springer, USA.

Yi, X. J., Wang, Y e Yu, F. S. X. (2000). Corneal epithelial tight junctions and their response to lipopolysaccharide challenge. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 41(13), pp: 4093-4100.

Zignani, M., Tabatabay, C y Gurny, R. (1995). Topical semi-solid drug delivery: kinetics and tolerance of ophthalmic hydrogels. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 16(1), pp: 51-60.

CAPÍTULO III: MICROEMULSIONES – EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD DE AUTOCONSERVACIÓN.

INTRODUCCIÓN

En pacientes con glaucoma, existe una serie de factores de riesgo que pueden predisponer a enfermedades de la superficie ocular, entre ellos se incluyen: el sexo, la edad, extensa duración del tratamiento (enfermedad crónica), múltiples comorbilidades y sus medicamentos asociados así como el origen étnico. En tales casos, resulta razonable evitar el riesgo adicional de padecer enfermedades de la superficie ocular originadas tras la normal exposición a conservantes durante la terapia antiglaucomatosa (*Thygesen, 2018*).

Las manifestaciones en superficie impactan profundamente sobre la calidad de vida y pueden influir en la adherencia del paciente al tratamiento, además de provocar una variedad de consecuencias negativas a nivel ocular, las cuales se manifiestan a largo plazo (*Baudouin et al, 2010*).

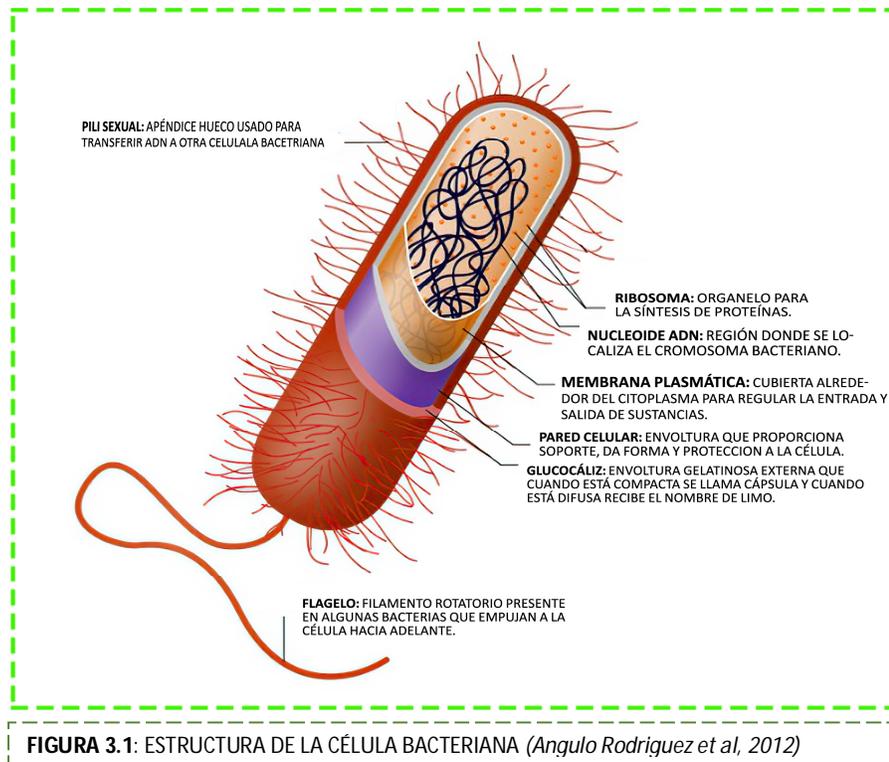
Por lo anteriormente expuesto, para el tratamiento de esta enfermedad, la terapia tópica sin conservantes constituye una buena vía de elección. Consecuentemente, en el presente trabajo de Tesis Doctoral, se diseñaron formulas con potenciales propiedades de autoconservación, a los fines de ofrecer ventajas tales como: mejoras en la calidad de vida del paciente y menor incidencia de enfermedades en la superficie ocular, a un costo mínimo.

A continuación se detallarán conceptos generales asociados a la estructura, composición química, y clasificación de las bacterias, véase Figuras 3.1, 3.2, 3.3, 3.4 y Tabla 3.1.

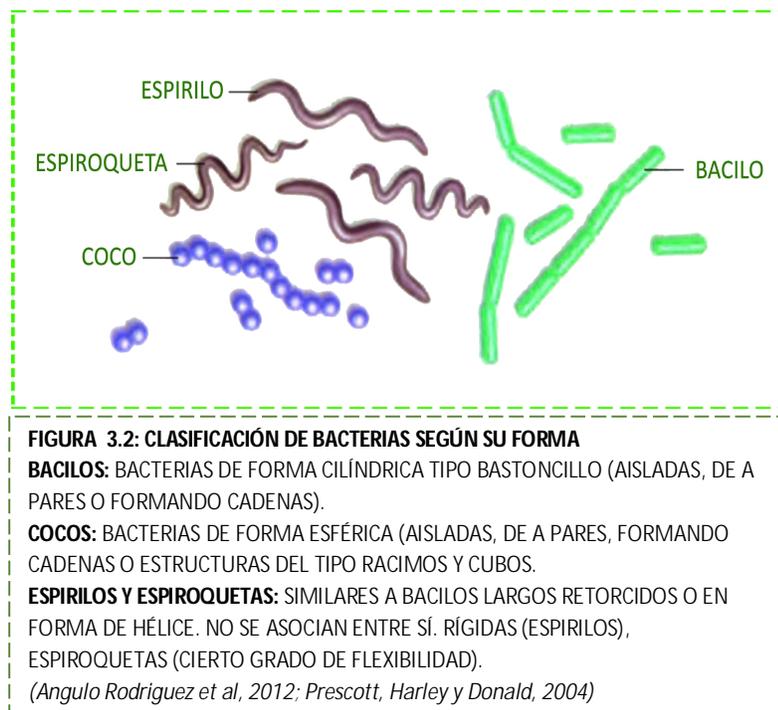
Asimismo, se describirán microorganismos (bacterias, hongos y levaduras) de alto impacto sanitario que funcionan, en su mayoría, como contaminantes de productos farmacéuticos por lo que han sido objeto de estudio a los fines de determinar la potencial capacidad de autoconservación de la fórmula ocular diseñada.

BACTERIAS

ESTRUCTURA DE LA CÉLULA BACTERIANA



CLASIFICACIÓN DE LAS BACTERIAS SEGÚN SU FORMA



CLASIFICACIÓN DE BACTERIAS SEGÚN TÉCNICAS DE TINCIÓN DIFERENCIAL

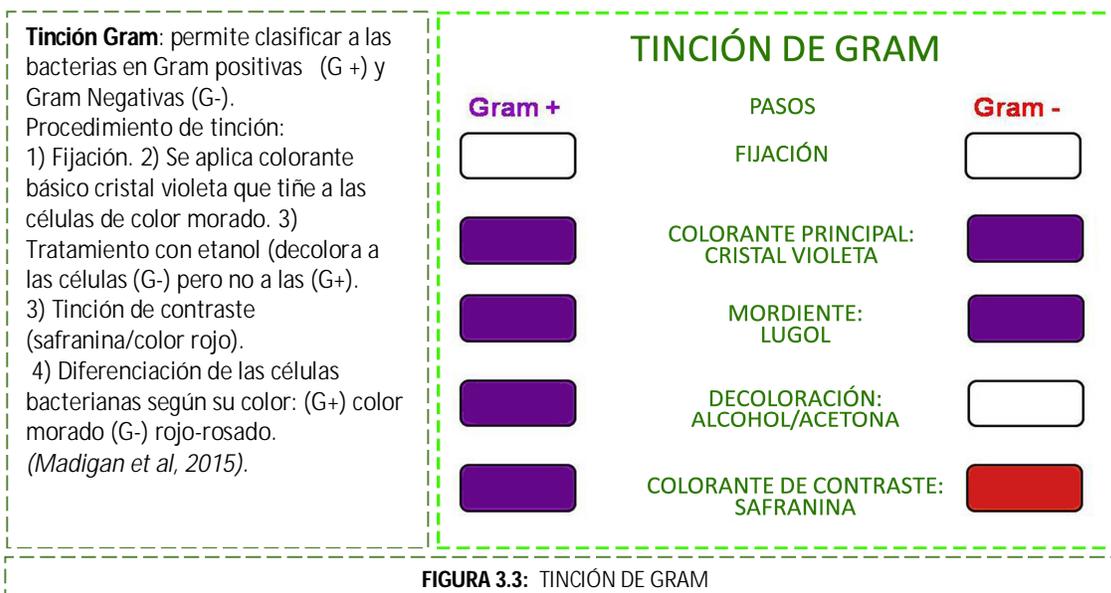


FIGURA 3.3: TINCIÓN DE GRAM

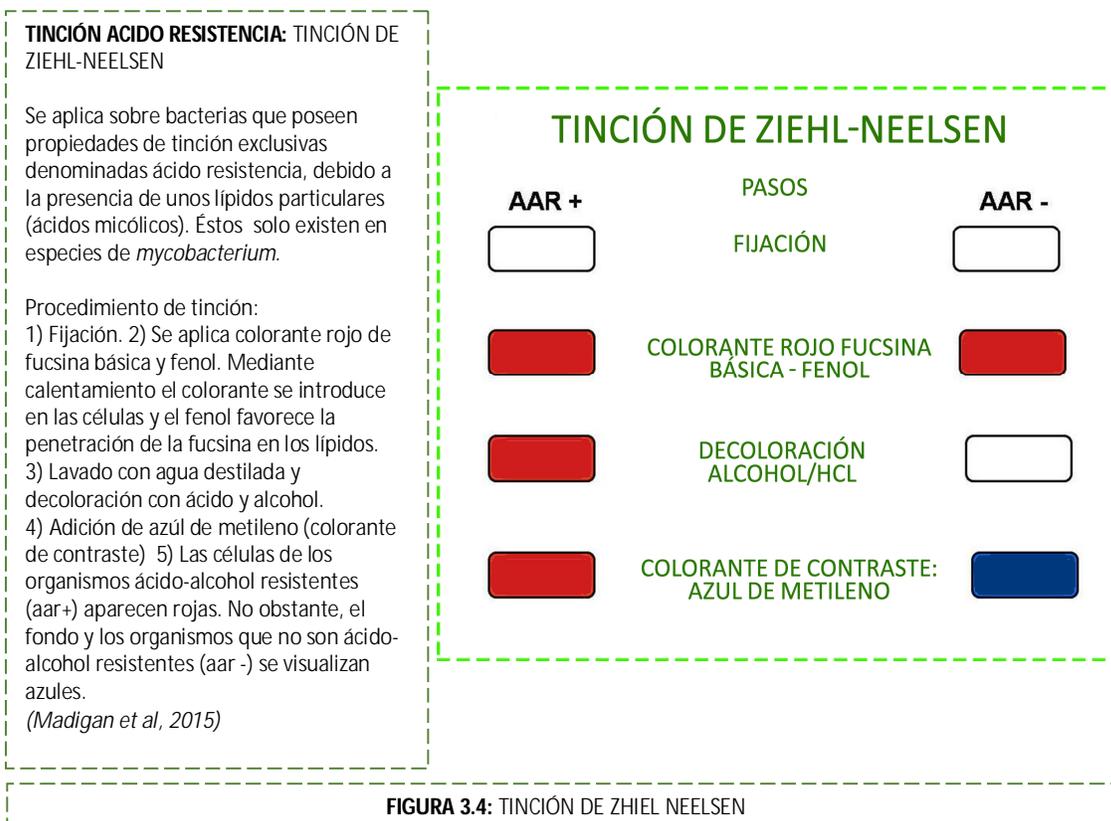
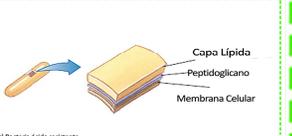


FIGURA 3.4: TINCIÓN DE ZIEHL NEELEN

ALGUNAS CARACTERÍSTICAS COMPARATIVAS DE BACTERIAS G(+), G(-) Y AAR(+)
(MICOBACTERIAS)

TABLA 3.1: BACTERIAS G(+), G(-) Y AAR (+) (MICOBACTERIAS) – CARACTERÍSTICAS (Angulo Rodriguez et al, 2012; Black y Black, 2015; Tortora, Funke y Case, 2007)

	BACTERIA GRAM NEGATIVA	BACTERIA GRAM POSITIVA	MICOBACTERIAS
ESTRUCTURA	MEMB. CITOPASMÁTICA, ESPACIO PERIPLASMÁTICO, CAPA INTERNA DE PEPTIDOGLICANO, MEMBRANA EXTERNA.	MEMBRANA CITOPASMÁTICA, CAPA DE PEPTIDOGLICANO.	CAPA LIPÍDICA, CAPA DE PEPTIDOGLICANO, MEMBRANA CITOPASMÁTICA.
			
COMPOSICIÓN QUÍMICA	CAPA INTERNA: DELGADA. CAPA (2-7NM) CONSTITUIDA POR PEPTIDOGLICANO (LAS UNIDADES DEL MISMO CONSISTEN N-ACETIL GLUCOSAMINA Y N-ACETIL MURÁMICO QUE SE ENLAZAN DIRECTAMENTE A TRAVÉS DE LOS TETRAPÉPTIDOS (L-ALANINA, D-ALANINA, D-ÁCIDO GLUTÁMICO, EL ÁCIDO DIAMINOPIMÉLICO (DAP)). EL ENTRECRUZAMIENTO DEL PEPTIDOGLICANO ESTÁ FORMADO POR UN ENLACE PEPTÍDICO ENTRE EL GRUPO AMINO DE DAP DE UNA CADENA DE GLICANO Y EL GRUPO CARBOXILO DE LA D-ALANINA TERMINAL DE LA CADENA DE GLICANO ADYACENTE. ESPACIO PERIPLASMÁTICO: COMPUESTO POR ENZIMAS QUE PARTICIPAN EN MECANISMOS DE TRANSPORTE, DEGRADACIÓN Y SÍNTESIS. MEMBRANA EXTERNA: FOSFOLÍPIDOS CON ÁCIDOS GRASOS SATURADOS, PROTEÍNAS, PORINAS, LIPOPROTEÍNAS, PROTEÍNAS DE TRANSPORTE. LIPOPOLISACÁRIDO (LPS O ENDOTOXINA): LÍPIDO A, POLISACÁRIDO CENTRAL (NÚCLEO DEL POLISACÁRIDO) Y ANTÍGENO "O" (POLISACÁRIDO O ESPECÍFICO DE TAMAÑO VARIABLE). MEMBRANA CELULAR: BICAPA DE FOSFOLÍPIDOS, PROTEÍNAS, GLICOPROTEÍNAS	PARED CELULAR HOMOGÉNEA Y GRUESA (20 - 80 NM) COMPUESTA POR PEPTIDOGLICANO (HETEROPOLÍMERO ALTERNANTE DE POLI-N-ACETIL-GLUCOSAMINA Y ÁCIDO N-ACETIL-MURÁMICO). CADA UNIDAD DE N-ACETIL-MURÁMICO SE ENCUENTRA UNIDO A UN TETRAPÉPTIDO (SEGMENTO DE 4 AMINOÁCIDOS). EL ENTRECRUZAMIENTO SE PRODUCE A TRAVÉS DE UN PEQUEÑO PUENTE PEPTÍDICO EN EL QUE LA CLASE Y NÚMERO DE AMINOÁCIDOS VARIAN DE UNA ESPECIE A OTRA. ÁCIDOS TEICOICOS: (FOSFATO DE POLIRIBITOL O GLICEROL-FOSFATO UNIDOS AL PEPTIDOGLICANO). ÁCIDO LIPOTEICOICO: ÁCIDO TEICOICO UNIDO A LÍPIDOS MEMBRANA CELULAR: BICAPA DE FOSFOLÍPIDOS, PROTEÍNAS Y GLICOPROTEÍNAS.	PARED CELULAR COMPUESTA POR: LÍPIDOS (ÁCIDO MICÓLICO) (60%) . DELGADA CAPA DE PEPTIDOGLICANO (CONSTITUIDA POR UNIDADES REPETITIVAS DE N-GLUCOSAMINA Y N-ACETIL MURÁMICO CONECTADOS POR PÉPTIDOS DE LOS QUE FORMAN PARTE LA L-ALANINA, D-ISOGLUTAMINA, AC. MESO DIAMINO PIMÉLICO Y D-ALANINA ENTRE LOS QUE SE ESTABLECEN DOS TIPOS DE UNIONES INTERPEPTÍDICAS (MESO DIAMINOPIMÉLICO – MESODIAMINOPIMÉLICO Y MESODIAMINOPIMÉLICO-D-ALANINA). MEMBRANA CELULAR: BICAPA DE FOSFOLÍPIDOS, PROTEÍNAS Y GLICOPROTEÍNAS
LÍPIDOS	MAYOR PROPORCIÓN QUE G(+)	ESCASA PROPORCIÓN	ELEVADA PROPORCIÓN
PERMEAB. MOLECULAR	<	>	<<
RESISTENCIA MOLECULAR	>	<	>>
TINCIÓN	RESPUESTA ANTE TINCIÓN GRAM: NEGATIVA. RETIENEN SAFRANINA. ADQUIEREN COLOR ROJO-ROSADO.	RESPUESTA ANTE TINCIÓN GRAM: POSITIVA. RETIENEN CRISTAL VIOLETA-YODO. ADQUIEREN COLOR MORADO.	RESPUESTA ANTE TINCIÓN DE GRAM: NO SE TIÑEN BIEN CON LA TINCIÓN DE GRAM. IDENTIFICACIÓN MEDIANTE COLORACIÓN ZIEHL NEELSEN: ADQUIEREN COLOR ROJO

MICROORGANISMOS DE ALTO IMPACTO SANITARIO

BACTERIAS GRAM POSITIVAS

Staphylococcus aureus: el género *Staphylococcus* está abundantemente distribuido en la naturaleza, encontrándose frecuentemente en la piel y mucosas de humanos y otros primates (pudiendo localizarse en boca, sangre, glándulas mamarias, intestino, tracto genitourinario y vías aéreas respiratorias de sus huéspedes) (Fernández, 2013).

La presencia del género *Staphylococcus* y particularmente *S. aureus* en una materia prima o producto farmacéutico o cosmético, indica que la fuente de contaminación puede ser humana.

Staphylococcus aureus consiste en un coco (G+) perteneciente a la familia *Micrococcaceae*. Constituye, probablemente, el más versátil de los microorganismos patógenos. Puede producir enfermedad por superantígenos o toxinas, invadir cualquier órgano o tejido y originar supuración, necrosis tisular, celulitis, impétigo e infecciones post operatorias (Fernández, 2013) trombosis vascular entre otras. Es el microorganismo con mayor capacidad de diseminarse por vía hematológica (Jung et al, 2016).

Su importancia clínica radica en el alto grado de morbilidad y mortalidad en comparación con otros patógenos y adicionalmente, ha sido identificado como la principal causa de bacteriemia en numerosas áreas geográficas (Naber, 2009).

Otras infecciones mayores ocasionadas por este microorganismo son: endocarditis aguda, meningitis, abscesos en músculo, neumonía, osteomielitis, entre otros (Fernández, 2013).

A nivel oftalmológico, las infecciones más comunes causadas por microorganismos oportunistas, dentro de los que se incluyen diversas especies del género *staphylococcus*, son la conjuntivitis: *staphylococcus epidermidis*, *staphylococcus saprophyticus*, *staphylococcus cohnii*, *staphylococcus haemolyticus*, blefaritis (blefaritis ulcerativa casi siempre asociada al género *staphylococcus* como factor etiológico), dacriocistitis (*staphylococcus epidermidis*), endoftalmitis (diversas especies de *staphylococcus*), celulitis orbitaria y preseptal (*staphylococcus epstidermidis*), queratitis (Azari y Barney, 2013; Durand, 2013; Hsiao et al, 2012; Wong et al, 2011)

Las septicemia causada por *staphylococcus* suele estar asociada a endoftalmitis y coriorretinitis ocasionando generalmente importante pérdida visual (Jung et al, 2016).

BACTERIAS GRAM NEGATIVAS

Pseudomonas aeruginosa: es un bacilo (G-) no fermentador de la glucosa, constituye uno de los más importantes patógenos, dentro del género *Pseudomonas*, debido al

número y tipo de infecciones que ocasiona y a la elevada morbilidad y mortalidad asociada (Fernández, 2013).

Este microorganismo se caracteriza por su hipermutabilidad, el desarrollo de múltiples mecanismos de adaptación y fenómenos de resistencia tanto intrínseca como adquirida lo que le ha permitido dar origen a cepas multidrogo-resistentes (Horcajada, et al, 2019).

Pseudomonas aeruginosa es intrínsecamente resistente a diversas clases de antibióticos que no guardan relación estructural entre sí, debido a la disminución de la permeabilidad de su membrana externa, a la expresión constitutiva de varias bombas de expresión expulsoras de fármacos y a la producción de enzimas que inactivan a los antibióticos (Pang et al, 2019).

El espectro de enfermedades causadas por este microorganismo varía desde una infección localizada hasta infección generalizada o septicemia (Fernández, 2013). Los individuos inmunocomprometidos son los que más se ven afectados, siendo la contaminación del agua la causa de infección más frecuente.

Asimismo, este microorganismo suele desarrollar en soluciones oftálmicas acuosas (Fernández, 2013; Scroth, Hildebrand y Panoupoulos, 2006). De este modo, a nivel ocular, la infección causada por *P. aeruginosa* está frecuentemente relacionada al uso de lentes de contacto y de soluciones de lavado de lentes de contacto contaminadas con este microorganismo. La queratitis ocasionada por *P. aeruginosa* se puede diseminar rápidamente invadiendo la totalidad de la córnea en pocas horas, generando ulceración que puede progresar en perforación y pérdida de la función visual (Fernández, 2013; Stapleton et al, 2007).

La infección más severa causada por este microorganismo es la endocarditis por administración endovenosa de suspensiones o soluciones de fármacos basadas en vehículos acuosos contaminados. De ahí, la importancia de determinar la presencia de *P. aeruginosa* en productos farmacéuticos que van a ser administrados en vehículos acuosos por vía intravascular, inhalatoria u ocular (Fernández, 2013).

Escherichia coli: corresponde a la familia Enterobacteriaceae que está formada por bacilos (G-). Vive en ambientes variados. Se encuentra en el suelo, agua y en organismos vivos, incluidos animales, seres humanos y plantas. *E. coli* es típicamente un

comensal y forma parte de la biota normal presente en materia fecal de humanos y animales inferiores (Manod, 2010).

La especie *Escherichia coli* contiene varios patotipos que causan una variedad de enfermedades. Al menos seis patotipos diferentes [*E. coli enteropatógena* (ECEP), *E. coli enteroinvasiva* (ECEI), *E. coli enterotoxigénica* (ECET), *E. coli enteroagregativa* o enteroadherente (ECEAgg o ECEA), *E. coli* de adherencia difusa (ECAD) y *E. coli* shigatoxigénica (ECST), dentro de las que se encuentra *E. coli enterohemorrágica* (ECEH)-agente causal de mayor relevancia responsable del Síndrome Urémico Hemolítico (SUH)] causan enfermedad entérica, como diarrea o disenteria, en tanto otros generan infecciones extra intestinales, incluidas infecciones del tracto urinario (UPEC) y meningitis, septicemia (MNEC) (Kaper, Nataro y Mobley, 2004).

Escherichia coli shigatoxigenica constituye el agente causal de mayor relevancia, responsable del síndrome urémico hemolítico (SUH), se transfiere al hombre por ingesta de agua/alimentos contaminados o a través del contacto directo con animales o humanos portadores (Nataro y Kaper, 1998; Aranda, Fagundes y Scaletsky, 2004)

El SUH consiste en una entidad clínica caracterizada por presentación aguda de daño renal, anemia hemolítica microangiopática y trombocitopenia, que puede afectar al intestino, corazón y sistema nervioso central. Esta enfermedad se presenta, generalmente en su forma típica de etiología infecciosa precedida por un período prodrómico caracterizado por diarrea seguido de falla renal aguda (Noris 2005, Gianantonio, 1964).

BACTERIAS ÁCIDO-ALCOHOL RESISTENTES

Se han identificado una variedad de micobacterias asociadas a enfermedades en seres humanos. Clínicamente, la especie más importante es *Mycobacterium tuberculosis*, que constituye el agente causal de tuberculosis.

La tuberculosis en bovinos y humanos también es causada por *Mycobacterium bovis*. Si bien estas especies patógenas exhiben algunas diferencias fenotípicas, son genéticamente muy similar y, por lo tanto, a menudo se clasifican como 'Complejo *Mycobacterium tuberculosis*'. Otras micobacterias patógenas incluyen el complejo *Mycobacterium avium* (MAC) y las micobacterias no tuberculosas (NTM, micobacterias atípicas, o micobacterias ambientales). Ambos grupos son patógenos oportunistas

frecuentes, particularmente en individuos inmunosuprimidos (*Percival y Williams, 2014*).

Atendiendo a las enfermedades oculares, tema central de la Tesis, se ha reportado una gran variedad de infecciones causadas por micobacterias no tuberculosas cuya prevalencia ha ido aumentando a lo largo de las últimas décadas. Estos microorganismos, causan daños peri-oculares en anexos, así como en la superficie ocular y en la región intraocular manifestando, con frecuencia, resistencia a la terapia médica por lo que resultan potencialmente perjudiciales.

Las intervenciones quirúrgicas, traumatismos, implantes, el uso de lentes de contacto y el empleo de esteroides están asociados a infecciones oculares causadas por micobacterias no tuberculosas (*Kheir et al, 2015*).

HONGOS FILAMENTOSOS Y LEVADURAS

Los hongos a diferencia de las bacterias son organismos eucariotas. Entre los patógenos, que constituyen esta agrupación, se incluyen cepas de *Aspergillus* y *Cándida albicans* (*Fernandez, 2013*).

Las soluciones oftálmicas, ungüentos, supositorios, pomadas, cosméticos, jabones entre otros, constituyen productos farmacéuticos susceptibles a la contaminación causada por hongos filamentosos y levaduras.

Las levaduras son esencialmente hongos unicelulares; solo unas pocas especies se consideran potencialmente patógenas aunque en su mayoría son responsables de la alteración de productos (*Fernandez, 2013*).

Candida albicans es un hongo diploide asexual generalmente situado en la cavidad oral, en el tracto gastrointestinal y en la vagina. Puede asumir patogenicidad provocando vaginitis (candidiasis vaginal), muguet (candidiasis en cavidad oral) y afectar además al tracto gastrointestinal o piel. Esta afección puede ser superficial o tornarse sistémica en personas con sistema inmunológico deficiente (*Fernández, 2013*).

EMPLEO DE CONSERVANTES EN FORMAS FARMACÉUTICAS

Los conservantes se agregan a los productos farmacéuticos para evitar el deterioro microbiano proteger al paciente de una potencial infección. No obstante, su seguridad se ve cuestionada (*Rosin y Bell, 2013*).

El Cloruro de Benzalconio es un compuesto activo que actúa como conservante en varios productos incluidos gotas óticas, aerosoles o gotas nasales, productos para el cuidado y desinfección para manos, champúes, desodorantes y cosméticos; antisépticos para la piel, gotas oculares, etc (*Choi et al, 2020*).

En lo que respecta a las formulaciones de uso oftalmológico es necesario destacar que un número importante de los efectos adversos causados por el uso crónico, estaría asociado a los agentes conservantes, más que a los principios activos que las componen (*Baudouin et al, 2010*).

En los colirios, el Cloruro de Benzalconio es el conservante más utilizado y sin duda también el más estudiado, encontrándose en un gran número de fórmulas comerciales (*Akwa Tears, Allergy Drops, Comfort Tears, Comfort Eye Drops, Contactol, Dacriosol, Dacrolux, Degest 2, Enuclene, Estivin II, Hypotears, Hypo Tears, Isopto Fluid, Isoptofrin, Isopto Tears, Just Tears, Lacrinorm, Lacrisifi, Lacrisol, Larmabak, Moisture Drops, Murine, Murine Plus, NutraTear, Prefrin, Siccagel, Siccaprotect, Soothe, Tearisol, Tears Naturale, Tears Renewed Visine Extra, Zinfrin, Azopt, Cosopt*).

Las concentraciones típicas empleadas varían de 0.004 a 0.01%. Concentraciones más elevadas pueden ser abrasivas y causar daño irreversible en el endotelio corneal (*Choi et al, 2020*). Estudios in vitro, en animales de experimentación, han demostrado que este conservante causa efectos nocivos en varias estructuras oculares, incluyéndose la película lagrimal, córnea, conjuntiva y células trabeculares. Asimismo, se ha informado que genera queratitis punteada superficial y/o queratopatía ulcerativa tóxica (*Baudouin, 2008*).

NANO/MICROEMULSIONES - EFECTO ANTIMICROBIANO

Las microemulsiones al actuar como antimicrobianos por sí solas, constituirían una buena opción para la fabricación de fórmulas libres de agentes conservantes. Esta teoría se basa en la hipótesis de que las bacterias no pueden sobrevivir en grasas o aceites puros (requieren agua para el crecimiento y reproducción).

En las microemulsiones o/w el agua se encuentra fuertemente unida a la microestructura y no disponible para los microorganismos, es decir, este tipo de sistemas tiene una actividad acuosa (a_w) baja, encontrándose el agua unida en su mayoría a los grupos polares presentes en los surfactantes (*Al-Adham et al, 2000*).

Si bien el empleo de las nanoemulsiones como agentes antibacterianos constituye una aplicación relativamente nueva y promisoría, en la bibliografía se han reportado las posibles vías mediante las cuales este tipo de formulaciones promueven la actividad biocida, mencionándose las que se detallan a continuación:

- Algunos sistemas del tipo microemulsión actuarían mediante ataque directo en la estructura celular resultando en una perturbación y disfunción de la membrana. Este nivel de disfunción podría potencialmente generar la muerte celular en células procariotas (*Al-Adham et al, 2000*).
- Las formulaciones nanométricas poseen un área superficial elevado determinado por el reducido tamaño de las gotas de aceite cuya aumentada tensión superficial les permite fusionarse y ocasionar disrupción de la membrana plasmática presente en células procariotas no viéndose afectadas las células eucariotas de organismos superiores (*Kadri et al, 2017*).
- La actividad antimicrobiana de las microemulsiones, a diferencia de los antibióticos, es inespecífica favoreciendo un amplio espectro de actividad y limitando la capacidad de generación de resistencia. Estas propiedades hacen que la microemulsión constituya un buen candidato para el tratamiento y desinfección de heridas (*Hemmila et al, 2010; Hwang et al, 2013*).

Por otro lado, existen antecedentes bibliográficos en donde se reporta para aceites esenciales actividad antimicrobiana sobre bacterias Gram positivas, Gram negativas y

Hongos (Pandey et al, 2017; Kalemba y Kunicka, 2003; Lee et al, 2008; Nazzaro et al, 2017; Puškárová et al, 2017).

El beneficio de emplear aceites esenciales como antimicrobianos respecto de compuestos químicos sintéticos con actividad antibacteriana, reside en el hecho de que la actividad bacteriostática/bactericida no se atribuye únicamente a un solo componente dado que son varios los compuestos fitoquímicos que constituyen un aceite esencial y actúan sinérgicamente (mediante múltiples mecanismos de acción) para promover dicha actividad. De este modo, la actividad antibacteriana del aceite esencial podría focalizarse en el tratamiento de cepas resistentes a antibióticos convencionales. Asimismo, dicha actividad depende de la lipofilia de los componentes que constituyen el aceite. Las moléculas de cadena hidrocarbonada corta interactúan con la bicapa lipídica generando: cambios en el potencial de membrana celular, inhibición de la síntesis de la pared celular y aumento de la fluidez de la membrana con la consecuente ruptura y pérdida de material citoplasmático (Severino et al, 2018).

Por otra parte, las moléculas de aceite esencial se pueden unir o inhibir proteínas específicas y causar daño del DNA o RNA viéndose afectada la replicación cromosómica o la transcripción. Además, los aceites esenciales podrían actuar interfiriendo en la expresión de genes que codifican factores de virulencia tal es el caso de cepas de *staphylococcus aureus*, productoras de enterotoxinas (Severino et al, 2018).

Referido a las formulaciones nanométricas basadas en estos aceites, cabe destacar que, Moghimi y sus colaboradores (2016) comprobaron que el efecto antimicrobiano causado por un aceite esencial nanoformulado, sobre la cepa bacteriana *E.coli*, mejoraba significativamente respecto del aceite sin formular. Por otra parte, Salvia Trujillo y colaboradores (2015), expusieron al mismo enteropatógeno frente a una gran variedad de esencias incorporadas a las microemulsiones. Mediante estos ensayos se pudo evidenciar el potencial uso de los aceites esenciales como agentes conservantes de alimentos.

Las propiedades antibacterianas intrínsecas que presentarían los sistemas nanométricos sumado a la actividad biocida reportada para los aceites esenciales, llevó a postular la hipótesis de auto-conservación de la microemulsión de Citronella diseñada.

TESTS DE EFICACIA CONSERVADORA DE AGENTES CONSERVANTES

Los fármacos o cosméticos, pueden contaminarse durante su producción y a través de las materias primas debido a la presencia de procedimientos no adecuados durante la fabricación o uso, especialmente si se trata de envases multidosis o de productos con alto contenido de agua.

La contaminación microbiana puede afectar a la salud del paciente o alterar las características organolépticas del producto. Por lo anteriormente expuesto, para asegurar la estabilidad continua y seguridad del producto farmacéutico en cuestión, se añaden agentes conservantes (*Halla et al, 2018*).

La eficacia, en términos de actividad antimicrobiana, asociada al uso de los conservantes se determina mediante ensayos microbiológicos.

Como fuente de guía para la realización de los estudios nos basaremos en tres de las organizaciones que han establecido las bases: Farmacopea Europea (EP), la Farmacopea de Estados Unidos (USP) y la Farmacopea Británica (BP). “Estas instituciones han desarrollado recomendaciones específicas, tanto para el ensayo en sí como para los microorganismos de desafío empleados, medios de cultivo y condiciones de crecimiento y almacenamiento (requisitos que son estandarizados a fin de lograr respuestas reproducibles)” (*D’Aquino y Teves, 2013*).

Los ensayos consisten en inocular al producto con una misma especie incubando a la temperatura especificada durante períodos de tiempo prefijados y hasta un máximo de 28 días, examinándose el mismo posteriormente para cuantificar los microorganismos sobrevivientes a cada tiempo estipulado (*D’Aquino y Teves, 2013*).

En la Tabla 3.2, se detallan los microorganismos sugeridos por las diversas metodologías oficiales (*D’Aquino y Teves, 2013*).

En la Tabla 3.3 se especifican (de acuerdo a la vía de aplicación del producto farmacéutico) los criterios de aceptación de los agentes conservantes propuestos por las diferentes metodologías oficiales.

TABLA 3.2:
MICROORGANISMOS
SUGERIDOS SEGÚN
METODOLOGÍAS
OFICIALES (D'Aquino y
Teves, 2013).

MICROORGANISMOS	USP	BP	EP	ATCC
<i>E. coli</i>	+		+	8739
<i>P.aeuruginosa</i>	+		+	9027
<i>P.aeuruginosa</i>		+		19429 / 15442
<i>S.aureus</i>	+	+	+	6538
<i>Aspergillus brasiliensis</i>	+	+	+	16404
<i>Candida albicans</i>	+	+	+	10231

TABLA 3.3: CRITERIOS DE ACEPTACIÓN DE AGENTES CONSERVANTES SEGÚN METODOLOGÍAS OFICIALES Y VÍA DE APLICACIÓN DEL PRODUCTO FARMACÉUTICO (D'Aquino y Teves, 2013).

Sin paréntesis: Satisfactorio/Entre paréntesis y en Itálica: satisfactorio cuando no puede hallarse la efectividad recomendada.

NI: ausencia de incremento significativo (0,3-u log) (Sutton y Porter, 2002).

NR: recuperación nula, número de colonias=0.

METODOLOGÍA	BACTERIAS	HONGOS
USP		
OFTÁLMICOS Y PARENTERALES	3 LOG EN 14 DÍAS. , NI A LOS 28 D.	NO AUMENTA EN 14 Y EN 28 DÍAS
TÓPICOS	2 LOG EN 14 DÍAS	
ORALES	1 LOG EN 14 DÍAS	
BP		
OFTÁLMICOS Y PARENTERALES	3 LOG EN 6 H.	2 LOG EN 14 DÍAS
TÓPICOS	3 LOG EN 48 H	2 LOG EN 14 DÍAS
ORALES	2 LOG EN 7 DÍAS	NO AUMENTA EN 14 DÍAS
EP		
OFTÁLMICOS Y PARENTERALES	2 LOG EN 6 H – 3 LOG 24 H, NR A LOS 28 D (1 LOG EN 24 H -3/7 DÍAS), NI A LOS 28 D.	2 LOG EN 7 DÍAS, NI A LOS 28 D (1 LOG EN 14 DÍAS) NI A LOS 28 D
TÓPICOS	2 LOG EN 48 H 3 LOG 7 DÍAS (3 LOG EN 14 DÍAS)	2 LOG EN 14 DÍAS (1 LOG EN 14 DÍAS)
ORALES	3 LOG EN 14 DÍAS	1 LOG EN 14 DÍAS

Puede observarse que en los ensayos de Farmacopeas que son los más utilizados, se utilizan 5 microorganismos: 3 bacterias y 2 hongos (una levadura y un hongo filamentoso).

Las bacterias que se emplean como inóculo parten de una solución madre que contiene una concentración de 1×10^8 UFC/ml la cual se diluye posteriormente al 1% en el producto alcanzándose para el desafío una concentración final de 1×10^6 UFC/ml.

Para USP, BP, EP las bacterias se hallan en la concentración anteriormente especificada y los hongos en 10^{4-5} UFC/ml (D'Aquino y Teves, 2013).

USP (United States Pharmacopeia).

Esta metodología sufrió varios cambios en los últimos años a fin de poder armonizar con la Farmacopea Europea (D'Aquino y Teves, 2013; Sutton y Porter, 2002 ; USP 34, 2011)

TABLA 3.4: MEDIOS DE CULTIVO Y CONDICIONES DE CRECIMIENTO Y ALMACENAMIENTO SEGÚN USP (D'Aquino y Teves, 2013; USP 34, 2011).

MUESTRA EMPLEADA: 20 g o ml
VOLUMEN INCORPORADO: 0,1 ml DE SOLUCIÓN MICROBIANA PARTIENDO DE UN INÓCULO DE 10^8 UFC/ml
MICROORGANISMOS USADOS: BACTERIAS, HONGOS Y LEVADURAS ESPECIFICADOS EN TABLA 3.2
MEDIOS DE CULTIVOS TRIPTONA SOYA AGAR (TSA); AGAR SABOURAUD
PROCEDIMIENTO DE RECUENTO: POR AGAR FUNDIDO EN PLACA
TEMPERATURA INCUBACIÓN: TEMP. AMBIENTE/30-35°C- BACT. 25-30°C- HONGOS
TIEMPO DE INCUBACIÓN: VÉASE TABLA 3.3

BP (British Pharmacopeia)

TABLA 3.5: MEDIOS DE CULTIVO Y CONDICIONES DE CRECIMIENTO Y ALMACENAMIENTO SEGÚN BP (D'Aquino y Teves, 2013; British Pharmacopeia, 2008)

MUESTRA EMPLEADA: 20 g o ml
VOLUMEN INCORPORADO: 0,1 ml DE SOLUCIÓN MICROBIANA PARTIENDO DE UN INÓCULO DE 10^8 UFC/ml
MICROORGANISMOS USADOS: BACTERIAS, HONGOS, LEVADURAS , VÉASE TABLA 3.2
NO EMPLEA E. COLI, PERO PUEDE AÑADIRSE CUANDO PUEDE REPRESENTAR UN PELIGRO PARA EL PREPARADO
MEDIOS DE CULTIVOS: TRIPTONA SOYA AGAR (TSA) (BACTERIAS) AGAR SABOURAUD (HONGOS)
PROCEDIMIENTO DE RECUENTO: POR AGAR FUNDIDO EN PLACA.
TEMPERATURA INCUBACIÓN TEMP. AMBIENTE/ 30-35°C- BACT. 25-30°C- HONGOS.
TIEMPO DE INCUBACIÓN: VÉASE TABLA 3.3

EP (*European Pharmacopeia*).

La metodología es similar a BP, variando ligeramente en la interpretación de resultados véase TABLA 3.3 (*D'Aquino y Teves, 2013*).

De acuerdo con la Farmacopea Europea las moléculas aceptables como conservantes, deben cumplir con los valores sugeridos en Tabla 3.2 especificados sin paréntesis, correspondiendo éstos a la máxima eficacia que el conservante debería alcanzar (*European Pharmacopeia, 2008*).

Las fórmulas que no satisfacen el criterio anterior, deben cumplir con los requisitos del criterio señalado entre paréntesis en Tabla 3.3. Asimismo, no deberá observarse un incremento significativo (0,3-u log) en el número de UFC transcurridos los 28 días de la siembra del inóculo bacteriano (*Sutton y Porter, 2002*).

Referido a la EP, conforme a lo observado en Tabla 3.3, se puede concluir que las exigencias de esta Farmacopea son superiores al del resto de los métodos oficiales.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

- Prescindir de la incorporación de agentes químicos conservantes, intentando crear una nueva alternativa para la conservación de gotas oculares basada en el empleo de aceites esenciales.

OBJETIVO ESPECÍFICO

- Atendiendo a los valores de reducción microbiana sugeridos por los métodos oficiales, determinar la eficacia de auto-conservación de la microemulsión ocular de Citronella diseñada.

MATERIALES Y MÉTODOS

ENSAYOS PRELIMINARES DE EXPOSICIÓN – METODOLOGÍA APLICADA: BASADA EN MÉTODOS OFICIALES

A continuación se describe el procedimiento efectuado en el Laboratorio. La evaluación se realizó teniendo en cuenta las restricciones (valores de reducción logarítmica en función de tiempo de exposición) sugeridas por (EP). No obstante, en los ensayos programados se pretendió desafiar a las cepas bacterianas probadas modificando alguna de las condiciones de exposición.

Variaciones efectuadas: inóculo incorporado a la muestra 10^7 - 10^8 UFC/ml (bacterias) Hongos 10^6 UFC/ml. Sugerencia de la Farmacopea: 10^6 UFC/ml (bacterias) 10^{4-5} UFC/ml (hongos).

Volumen de producto farmacéutico empleado: **4,5 ml** (volumen sugerido 20 ml). Inóculo empleado 0,5 ml (se inoculó el 10% del volumen del producto, habiendo sugerido las farmacopeas no exceder el 1%).

Los ensayos microbiológicos han sido efectuados en el Laboratorio de Microbiología con la colaboración de la Dra. Mónica Baldini y la Bioquímica Soledad Oriani del Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia de la UNS.

PROCEDIMIENTO PARA DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD CONSERVANTE DE LA FÓRMULA

CEPAS ENSAYADAS EN EL LABORATORIO

Los estudios se han realizado sobre las siguientes cepas: *Cándida albicans* (cepa clínica) *Staphylococcus aureus* (cepa clínica), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) y *Mycobacterium gordonae* (aislada del medio ambiente, agua).

Esta última cepa bacteriana, según los métodos oficiales, no requería ser ensayada. Sin embargo, su evaluación resultó de interés debido a la complejidad en la estructura de la pared bacteriana y a que las micobacterias ambientales constituyen una de las principales causas de infecciones en piel y tejidos blandos.

PREPARACIÓN DEL INÓCULO MICROBIOLÓGICO INICIAL

MEDICIÓN DE LUZ TRANSMITIDA (Determinación de la densidad celular por Turbidimetría).

Es un método práctico y muy usado. Está basado en que las suspensiones bacterianas producen una turbidez proporcional al número de bacterias, dicha turbidez se compara con patrones.

ESCALA DE MC FARLAND

Se trata de una serie de patrones de turbidez previamente calibrados. Consiste en varios tubos de vidrio herméticamente cerrados que contienen {1% de Cl_2Ba + cantidades crecientes de SO_4H_2 al 1%}; en cada tubo se genera un precipitado de SO_4Ba , que origina a la turbidez. Para las diferentes cepas bacterianas se debe establecer la equivalencia entre la turbidez de cada tubo y la masa o la concentración de bacterias (en céls/ml) que dan lugar a una turbidez similar.

Referido a lo mencionado en el párrafo anterior, para realizar los ensayos microbiológicos, se prepara una suspensión bacteriana con turbidez equivalente a 0,5 de la escala de Mc Farland lo que permite ajustar la densidad de la suspensión bacteriana hasta aproximadamente 10^8 unidades formadoras de colonias (UFC) por mililitro (Koneman et al, 2006).

El estándar Mc Farland se prepara agregando 0.5 ml de 0,048 M de BaCl_2 (1,175% p/v de $\text{BaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$) a 99,5 ml de H_2SO_4 0,36 N. La densidad del mismo se determinó utilizando un espectrofotometría debiendo obtenerse, a 625 nm, valores de a absorbancia que oscilen ente 0,08 a 0,10 (Koneman et al, 2006).

RECUPERACIÓN DE BACTERIAS

MEDIOS DE CULTIVO EMPLEADOS

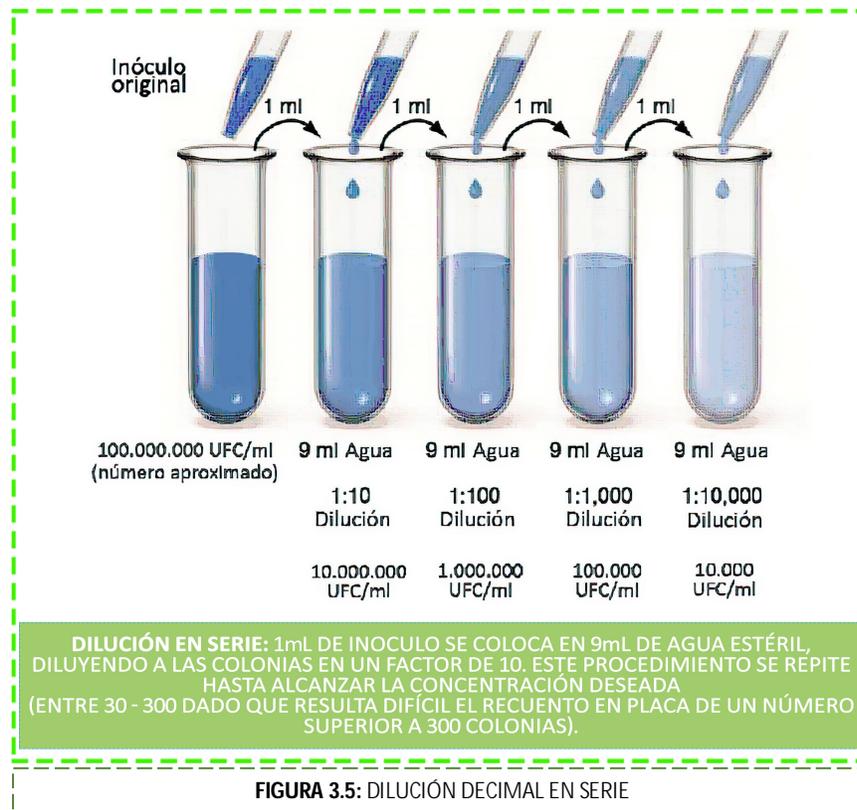
La cuantificación del inóculo se efectúa mediante la siembra en los medios apropiados en cada caso, agar para recuento en placa (PCA, Britania) para *S. aureus* y *P. aeruginosa*, Middlebrook 7H10 (Difco) para la Micobacteria y Sabouraud (Britania) para *C. albicans*.

DILUCIÓN DE LAS SUSPENSIONES CELULARES PREVIO A LA SIEMBRA EN PLACA

Resulta relevante que el número de colonias que aparece en las placas sea lo suficientemente pequeño como para que no se fusionen las colonias dando estimaciones erróneas pero lo suficientemente elevado como para lograr que el cálculo sea estadísticamente significativo. En la práctica la concentración deseada oscila entre 30-300 colonias.

Para obtener un número adecuado de colonias se efectúan diluciones decimales. Raramente se sabe de antemano el número de células viables, normalmente se hace más de una dilución, véase Figura 3.5 (*Madigan et al, 2015*).

De este modo, para obtener una dilución 1/10 se mezclaron 0,5 ml de las suspensiones bacterianas en 4,5 ml de la microemulsion de Citronella, efectuando las diluciones decimales correspondientes hasta obtener la dilución final deseada.



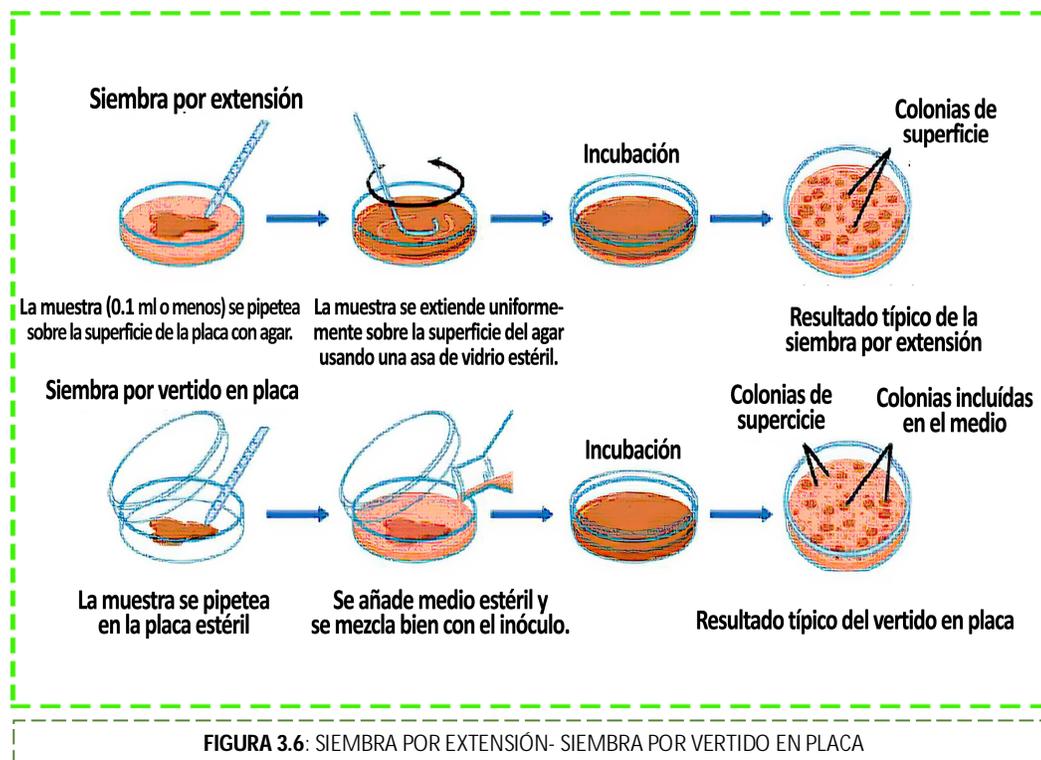
TÉCNICAS DE SIEMBRA EMPLEADAS

SIEMBRA POR VERTIDO EN PLACA: TÉCNICA DE AGAR VOLCADO

- Se caracteriza porque durante la incubación, las colonias crecen en interior de la masa del agar.
- Se deposita 1 ml de la muestra o de cada dilución en placas estériles, vacías.
- Se agrega a cada placa 18 ml del medio de cultivo a emplear, previamente fundido y mantenido a unos 47 °C.
- Se agita moviendo la placa tapada sobre la superficie de la mesa con movimientos circulares y de vaivén (siempre sin levantar la placa de la mesa). Con esto se consigue mezclar el inóculo con el agar.
- Se deja solidificar el agar a temperatura ambiente (esperar al menos media hora) y se llevan las placas a incubar.
- Pasado el tiempo de incubación las colonias habrán crecido dentro del agar (en la masa del agar), véase Figura 3.6.

SIEMBRA POR EXTENSIÓN

- Se caracteriza porque durante la incubación las colonias crecen en la superficie del agar.
- Se utilizan placas previamente preparadas que contienen el medio de cultivo solidificado (unos 18 ml/placa).
- Se deposita en la superficie del agar 0,1 ml de la muestra o de cada dilución.
- Luego de realizada la descarga de la muestra, se procede a extenderla sobre toda la superficie de las placas, usando un espátula de Drigalski estéril.
- Esperar 2 ó 3 minutos a que se seque el inóculo.
- Se llevan las placas a incubar y se procede de la misma manera que en el caso anterior, véase Figura 3.6 (*Madigan et al, 2015*).



EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA

Se toman 0,5 ml del inóculo inicial de cada cepa y se colocan en 4,5 ml de microemulsión isotónica de Citronella (dilución 1:10). Una vez transcurrido el tiempo de contacto estipulado (6 h, 24 h, 7 días, 14 días, 28 días) se realizan las diluciones decimales necesarias en cada caso.

De acuerdo a las técnicas de siembra utilizada, alícuotas de 10 μ l (diseminación en superficie) o 1000 μ l (agar volcado) se siembran en placas de Petri conteniendo los medios de cultivos mencionados previamente para obtener el recuento de microorganismos sobrevivientes.

RECuento DE CÉLULAS VIABLES/RECuento DE COLONIAS

La viabilidad en microbiología se define como la capacidad del microorganismo para multiplicarse en medio sólido formando una colonia.

El recuento de bacterias en medios sólidos se fundamenta en que cada bacteria desarrollará en una colonia, pero debemos tener en cuenta que las bacterias que se hallan en crecimiento no siempre se encuentran aisladas, por ello, una colonia puede provenir de una o más bacterias. En base a este criterio y a fin de evitar un recuento de células viables erróneamente menor, los recuentos en medios sólidos se expresan como unidades formadoras de colonias por mililitro y no como número de células viables (*Madigan et al, 2015*).

Una vez transcurridos los tiempos de incubación (24 h, 48 h y los 7, 14 y 21 días) se eligieron las placas correspondientes a aquella dilución que presentaban entre 30 y 300 colonias/placa para evitar errores de conteo por exceso o por defecto (*Madigan et al, 2015*).

Para realizar el recuento, se empleó un cuenta-colonias New Brusnswik. Los resultados se expresaron como unidades formadoras de colonias ml^{-1} (UFC/ml) teniendo en cuenta el factor de dilución:

$$\text{Número de UFC/ml} = \text{Número de colonias} \times \text{factor de dilución}$$

INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS EXPRESADOS EN UNIDADES LOGARÍTMICAS

Si por ejemplo, se parte de un inóculo de 10^6 un log equivale a una reducción del 90%, o 900.000 organismos muertos 100.000 sobrevivientes; una disminución de dos log denota una reducción del 99% o 990.000 organismos muertos; tres log una reducción del 99.9%, o 999.000 organismos muertos; cuatro log equivalen a una reducción del 99.99%, o a 999.900 organismos muertos; y cinco log una disminución del 99.999% o 999.990 organismos muertos.

Los gráficos se presentan considerando la reducción log UFC/ml vs tiempo de exposición.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las preparaciones oftálmicas deben ser estériles. Sin embargo, la contaminación accidental durante el empleo de las mismas puede ocasionar efectos negativos sobre la salud del paciente. Consecuentemente, se añade a las fórmulas agentes conservantes a fin de evitar los efectos adversos causados por microorganismos que pueden introducirse inadvertidamente durante o luego del proceso de manufactura. Como se mencionó anteriormente, el test de exposición (Test Challenge o Test de efectividad conservante) está diseñado para medir el nivel de actividad biológica que posee el conservante de la formulación farmacéutica.

Para evaluar la eficacia del agente conservante se efectuó la contaminación artificial de la microemulsión de Citronella (muestra isotónica) con un número predeterminado de microorganismos seguido de la toma periódica de ejemplares, a determinados intervalos de tiempo.

Las muestras obtenidas a los tiempos prefijados, tras la recuperación en los medios adecuados, se emplearon para realizar recuento de los microorganismos sobrevivientes en la formulación.

Así, lo que se pretendió fue testear la habilidad de la gota oftálmica diseñada, para mantener un mínimo crecimiento microbiano tras la inoculación de algunos de los microorganismos sugeridos por los métodos oficiales (*Pseudomonas aeruginosa*, *Cándida albicans*, *Staphylococcus aureus*) habiéndose incorporado además al ensayo *Mycobacterium gordonae*.

Cabe destacar que, con el objeto general de desafiar a las cepas testeadas, se han modificado algunas de las condiciones del ensayo. Consecuentemente, se empleó: un número de UFC/ml que supera en cantidad (10^7 - 10^8 /bacterias; 10^7 - 10^6 hongos y levaduras) al inóculo estipulado por los métodos oficiales (Farmacopeas USP, EP, BP) y un volumen de muestra (4,5 ml) inferior al valor sugerido (20 ml).

Asimismo, por razones económicas se emplearon muestras clínicas de algunas cepas *Candida albicans* y *Staphylococcus aureus*. *Mycobacterium* se obtuvo del medio ambiente.

Pseudomonas aeruginosa consistió en una cepa ATCC. No obstante, su tipificación no coincidía con aquella requerida por las Farmacopeas.

Conforme a la concentración (UFC/ml) de bacterias inoculadas se graficó a los intervalos de tiempo dados el cambio observado en la concentración para cada uno de los microorganismos ensayados, expresándose estos descensos en términos de unidades logarítmicas (\log_{10}).

PROCESAMIENTO DE DATOS

- 1)** Tras la inoculación se efectuó el recuento bacteriano a diferentes tiempos (24 h, 48 h, 15 días, 28 días)
- 2)** Se calculó el promedio, desviación estándar y error para los resultados obtenidos para los microorganismos ensayados a los intervalos de tiempo analizados.
- 3)** Se convirtió en escala logarítmica los promedios y sus diferentes intervalos ($\bar{x} \pm \text{error}$); la conversión de los errores en escala logarítmica no determina un intervalo simétrico centrado en los valores de la media.
- 4)** El procesamiento de los datos se efectuó mediante Planilla Excel.

El análisis estadístico fue realizado con la colaboración del Dr. José Bavio (Departamento de Matemática - UNS).

ENSAYOS MICROBIOLÓGICOS PARA EVALUACIÓN DE LA EFICACIA CONSERVANTE DE LA MICROEMULSIÓN DE CITRONELLA

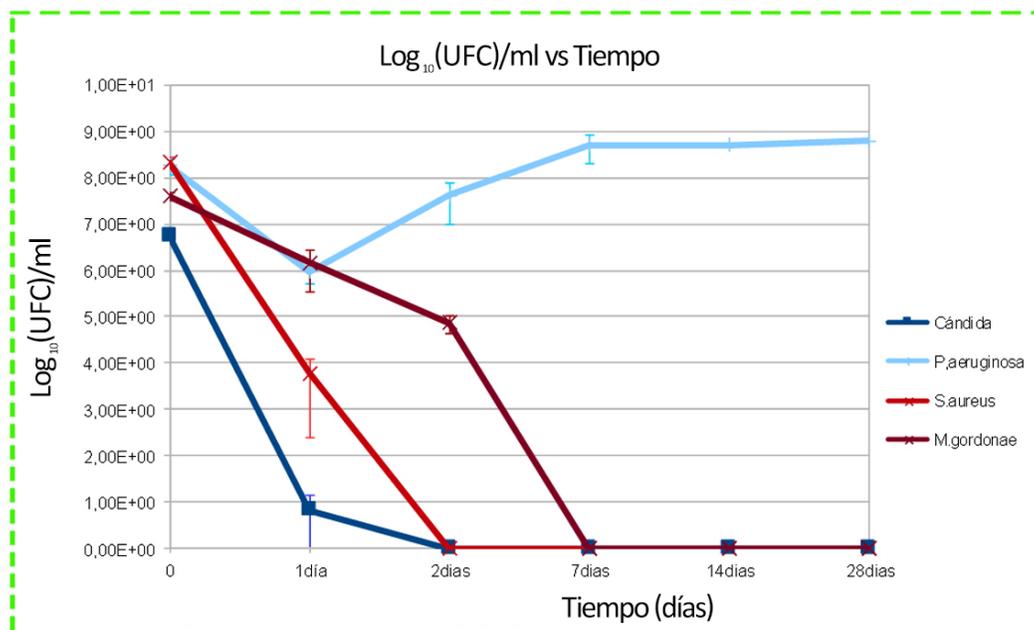


FIGURA 3.7: GRÁFICO DE LOG₁₀UFC/ml VS TIEMPO (DÍAS)

MUESTRA ENSAYADA: MICROEMULSIÓN DE CITRONELLA. COMPOSICIÓN (%P/P): CREMOPHOR EL - 2,38 %; BRIJ 35 - 2,38 %; TWEEN 80 - 4,76 %; ACEITE DE CITRONELLA - 2,38%; AGUA BIDEUTILADA + CLORURO DE SODIO - 88,10%. (LA CONCENTRACIÓN DE CLORURO DE SODIO DE LA FASE EXTERNA SE AJUSTÓ HASTA LOGRAR UN SISTEMA ISOTÓNICO).

En el caso de *Mycobacterium gordonae* se observó la reducción de 1.4 unidades logarítmicas a las 24 h, 2,8 unidades a las 48 h y 7,6 unidades logarítmicas a los 7 días manteniéndose nulo el crecimiento a los 7, 14 y 28 días, véase Figura 3.7.

Para *Staphylococcus aureus* se obtuvo una reducción de 4,6 unidades logarítmicas a las 24 h, 8,3 unidades a las 48 h no observándose desarrollo a los 7, 14 y 28 días.

La levadura ensayada (*Cándida albicans*) experimentó una reducción logarítmica de 5,9 unidades a las 24 h, 6,7 unidades a las 48 h, manteniéndose nulo el crecimiento bacteriano a los 14 días y 28 días, véase Figura 3.7.

Referido a estos resultados, es importante destacar que a pesar de haber aumentado la hostilidad de las condiciones del ensayo, dos de las tres cepas bacterianas expuestas (*Staphylococcus aureus*, *Mycobacterium gordonae*) así como la levadura (*Candida albicans*) han logrado superar ampliamente las expectativas habiéndose adaptado al criterio propuesto por USP, EP, BP para formulaciones tópicas y orales y al criterio

sugerido por USP y EP para la vía de administración ocular. Cabe destacar, que en el caso de la EP en lo referente a gotas oftálmicas, sólo se pudo cumplir con el criterio menos exigente (criterio expresado entre paréntesis), véase Tabla 3.3.

No obstante, para *Pseudomonas aeruginosa* el resultado no fue promisorio. En el experimento se puede observar con claridad que habiéndose partido de un inóculo del orden de 10^8 , si bien en el término de 24 h se produjo un descenso de microorganismos considerable 2.3 unidades logarítmicas, una vez transcurridas las 48 h el microorganismo logró reponerse y crecer alcanzando valores próximos a los iniciales.

La resistencia evidenciada podría deberse a un fenómeno adaptativo. Suele ocurrir en este caso y se ha reportado en otros tantos, que el crecimiento microbiano no es lineal. Estas curvas de mortalidad podrían deberse a la inactivación de múltiples sitios en la célula bacteriana o a la selección de los organismos sobrevivientes más resistentes que serían los responsables del resurgimiento de las bacterias en el producto farmacéutico.

Existen además antecedentes bibliográficos que demuestran que en los tests de eficacia de conservantes de soluciones farmacéuticas, *Pseudomonas aeruginosa* suele presentar propensión a este patrón de crecimiento (Akers y Walcott, 2007), es decir, aunque los agentes conservantes se incorporan a los productos farmacéuticos para prevenir el deterioro y contaminación microbiana, varios de los antimicrobianos empleados comúnmente (clorhexidina, cetrimida, fenólicos, alcohol fenilico, ácido benzoico, cloruro de benzalconio, y metil-parabenos) resultan degradados por microorganismos, en particular *Pseudomonas* (Bloomfield, 2007).

Por otra parte, se ha demostrado que los surfactantes (particularmente los no iónicos) empleados en formulaciones farmacéuticas, también están sujetos a degradación por bacterias, presentando esta capacidad un número reducido de organismos microbiológicos dentro del cual también se incluye a *Pseudomonas*. La susceptibilidad a la biodegradación del compuesto depende básicamente de la estructura química del surfactante, disminuyendo con el aumento de las ramificaciones y del largo de la cadena hidrocarbonada.

Asimismo, se ha comprobado que esta cepa bacteriana puede incluso adquirir resistencia y crecer en soluciones de desinfectantes utilizando al agente antimicrobiano como fuente de carbono (Bloomfield, 2007).

Se ha observado, además, que algunas cepas de *Pseudomonas* tienen capacidad para biodegradar compuestos (citronellol, citronellal, acetato de citronelilo) que constituyen los principales componentes de los aceites esenciales de una gran variedad de plantas y son responsables de las propiedades aromáticas y biológicas (incluyendo la actividad antimicrobiana atribuible a dichos aceites). Particularmente, *Pseudomonas aeruginosa* podría utilizar a los terpenoides acíclicos (citronellal, citronellol, geraniol) presentes en el aceite sintético empleado en la fórmula diseñada, como única fuente de carbono (Cantwell et al, 1978; Forster Fromme et al, 2006; Höschle y Jendrosseck, 2005).

Por otro lado, algunos aceites esenciales reducen la resistencia de microorganismos a fármacos por inhibición de las bombas de expulsión. Geraniol, como componente químico mayoritario del aceite sintético empleado en la fórmula ensayada, podría ser el responsable de este efecto farmacológico. No obstante, es importante considerar que en *Pseudomonas aeruginosa* la bomba MexAB-OprM puede expulsar mono-terpenos y alcoholes relacionados pudiendo este mecanismo ser empleado por células microbianas para reducir la actividad de los aceites esenciales (Buono, Demirci y Can Baser, 2017).

CONCLUSIÓN

Pseudomonas aeruginosa es un microorganismo que adquirió notoriedad como contaminante de productos farmacéuticos especialmente preparaciones oftálmicas, presentando patogenicidad a nivel ocular (ulceración en córnea y ceguera) y sobre todo peculiar resistencia a los agentes biocidas, *alguno de los cuales es capaz de metabolizar y biodegradar* tal como se estima podría estar sucediendo con geraniol, citronellal, citronellol y citronelil-acetato presentes mayoritariamente en el aceite sintético de Citronella empleado.

Para este microorganismo, la microemulsión diseñada no logró cumplir con los valores de reducción microbiana aceptados por las Farmacopeas (USP, EP, BP), por lo que esta formulación no podría emplearse prescindiendo del uso de agentes conservantes.

BIBLIOGRAFÍA

Akers, M. J. y Walcott, V. K. (2007). Official Methods of Preservative Evaluation and Testing. En: Denyer, S. P y Baird, R. M (eds). *Guide to Microbiological Control in Pharmaceuticals and Medical Devices*, pp. 383-396. CRC Press, USA.

Al-Adham, I. S, Khalil, E., Al-Hmoud N. D., Kierans, M y Collier, P. J. (2000). Microemulsions are membrane-active, antimicrobial, self-preserving systems. *Journal of Applied Microbiology*, 89(1), pp: 32-39.

Angulo Rodriguez, A. A., Galindo Uriarte, A. R., Avendaño Palazuelos, R. C y Pérez Angulo, C (eds). (2012). Unidad 1: Introducción a la Biología Celular. En: *Biología celular*, pp: 15-42. UAS-DGEP, México.

Aranda, R., Fagundes, U y Scaletsky, I. (2004). Evaluation of multiplex PCRs for diagnosis of infection with diarrheagenic *Escherichia coli* and *Shigella spp.* *Journal of Clinical Microbiology*, 42(12), pp: 5849-5853.

Azari, A. A. y Barney, N. P. (2013). Conjunctivitis. *Journal of the American Medical Association*, 310(16), pp: 1721-1729.

Baudouin, C. (2008). Detrimental effect of preservatives in eyedrops: implications for the treatment of glaucoma. *Acta Ophthalmologica*, 86(7), pp: 716-726.

Baudouin, C., Labbé, A., Liang, H., Pauly, A y Brignole-Baudouin, F. (2010). Preservatives in eyedrops: The good, the bad and the ugly. *Progress in Retinal and Eye Research*, 29 (4), pp: 312-334.

Black, J. G y Black L. J (eds). (2015). Characteristics of prokaryotic and eukaryotic cells. En: *Microbiology: Principles and Explorations*, pp: 77-114. John Wiley & Sons. Inc, USA.

Bloomfield, S. F. (2007). Microbial Contamination: Spoilage and Hazard. En: Denyer, S. P y Baird, R. M (eds). *Guide to Microbiological Control in Pharmaceuticals and Medical Devices*, pp: 23-50, CRC Press, USA.

British Pharmacopeia (2008).

Bueno, J., Demirci, F y Can Baser, K. H. (2018). Essential oils against microbial resistance mechanisms, challenges and applications in drug discovery. En: Rai, M., Zacchino, S y Derita, M. G. (eds). *Essential oils and nanotechnology for treatment of microbial diseases*, pp: 143-158. CRS Press Taylor & Francis Group, USA.

Cantwell S. G., Lau E. P., Watt D. S y Fall, R. R. (1978). Biodegradation of acyclic isoprenoids by *Pseudomonas* species. *Journal of Bacteriology*, 135(2), pp: 324-333.

Choi, H. Y., Lee, Y. H., Lim, C. H., Kim, Y. S., Lee, I. S., Jo, J. M.,... Seo, D. S. (2020). Assessment of respiratory and systemic toxicity of Benzalkonium chloride following a 14-day inhalation study in rats. *Particle and Fibre Toxicology*, 17(1), pp: 05-24.

D'Aquino, M y Teves, S. A. (2013). Conservadores en productos farmacéuticos y cosméticos. En: Cerra, H., Fernández, M. C., Horak, C., Lagomarsino, M., Torno, G., Zarankin, E. (eds). *Manual de microbiología aplicada a las industrias farmacéutica, cosmética y de productos médicos*, pp: 152-164. Asociación Argentina de Microbiología-Subcomisión de Buenas Prácticas de la División de Alimentos, Medicamentos y Cosméticos (BP), Buenos Aires, Argentina.

Durand, M. L. (2013). Endophthalmitis. *Clinical Microbiology and Infection*, 19(3), pp: 227-234.

European Pharmacopeia. (2008).

Fernández, M. C. (2013). Fuentes de contaminación microbiana de productos farmacéuticos y cosméticos. En: Cerra, H., Fernández, M.C., Horak, C., Lagomarsino, M., Torno, G., Zarankin, E. (eds). *Manual de microbiología aplicada a las industrias farmacéutica, cosmética y de productos médicos*, pp: 16-22. Asociación Argentina de Microbiología-Subcomisión de Buenas Prácticas de la División de Alimentos, Medicamentos y Cosméticos (BP), Argentina.

Forster-Fromme, K., Hoschle, B., Mack, C., Bott, M., Armbruster, W y Jendrosseck, D. (2006). Identification of Genes and Proteins Necessary for Catabolism of Acyclic Terpenes and Leucine/Isovalerate in *Pseudomonas aeruginosa*. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(7), pp: 4819-4828.

Gianantonio, C., Vittacco, M., Mendilaharzu, F., Ruty, A y Mendilaharzu, J. The hemolytic-uremic syndrome. *The Journal of pediatrics*, 64(4), pp: 478-491.

Halla, N., Fernandes, I., Heleno, S., Costa, P., Boucherit-Otmani, Z., Boucherit, K. ... Barreiro, M. (2018). Cosmetics Preservation: A Review on Present Strategies. *Molecules*, 23(7), pp: 1571-1612.

Hemmila, M. R., Mattar, A., Taddonio, M. A., Arbabi, S., Hamouda, T., Ward, P. A.,... Baker, J. R. (2010). Topical nanoemulsion therapy reduces bacterial wound infection and inflammation after burn injury. *Surgery*, 148(3), pp: 499-509.

Horcajada, J. P., Montero, M., Oliver, A., Sorlí, L., Luque, S., Gómez-Zorrilla, S.,... Grau, S. (2019). Epidemiology and Treatment of Multidrug-Resistant and Extensively Drug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Infections. *Clinical Microbiology Reviews*, 32(4), pp: 01-52.

Höschle, B y Jendrossek, D. (2005). Utilization of geraniol is dependent on molybdenum in *Pseudomonas aeruginosa*: Evidence for different metabolic routes for oxidation of geraniol and citronellol. *Microbiology*, 151(7), pp: 2277-2283.

Hsiao, C. H., Chuang, C. C., Tan, H. Y., Ma, D. H. K., Lin, K. K., Chang, C. J y Huang, Y. C. (2012). Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Ocular Infection: A 10-Year Hospital-Based Study. *Ophthalmology*, 119(3), pp: 522-527.

Hwang, Y. Y., Ramalingam, K., Bienek, D. R., Lee, V., You, T y Alvarez, R. (2013). Antimicrobial Activity of Nanoemulsion in Combination with Cetylpyridinium Chloride in Multidrug-Resistant *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 57(8), pp: 3568-3575.

Jung, J., Lee, J., Yu, S. N., Kim, Y. K., Lee, J. Y., Sung, H., ... Chong, Y. P. (2016). Incidence and Risk Factors of Ocular Infection Caused by *Staphylococcus aureus* Bacteremia. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 60(4), pp: 2012-2017.

Kadri, H. E., Devanthi, P. V. P., Overton, T. W y Gkatzionis, K. (2017). Do oil-in-water (O/W) nano-emulsions have an effect on survival and growth of bacteria?. *Food Research International*, 101, pp: 114-128.

Kalemba, D y Kunicka, A. (2003). Antibacterial and Antifungal Properties of Essential Oils. *Current Medicinal Chemistry*, 10(10), 813-829.

Kaper, J., Nataro, J y Mobley, H. (2004). Pathogenic *Escherichia coli*. *Nature Reviews Microbiology*, 2(2), pp: 123-140.

Kheir, W. J., Sheheitili, H., Fattah, M. A y Hamam, R. M. (2015). Nontuberculous Mycobacterial Ocular Infections: A Systematic Review of the Literature. *BioMed Research International*, 2015, pp: 01-17.

Koneman E. W., Winn, W. C., Allen, S. D., Janda, W. M., Koneman, E. W y Procop, G.W. (2006). Pruebas de sensibilidad a los antibióticos. En: Shreckenberger, P. C y Woods G. L (eds). Diagnóstico Microbiológico: Texto/Atlas y color, pp: 902-974. Editorial Médica Panamericana. S.A, USA.

Lee, Y. S., Kim, J., Shin, S. C., Lee, S. G y Park, K. (2008). Antifungal activity of *Myrtaceae* essential oils and their components against three phytopathogenic fungi Yeon-Suk. *Flavour and Fragrance Journal*, 23(1), pp: 23-28.

Madigan, M. T., Martinko, J. M., Bender, K. S., Buckley, D. H y Stahl, D. A (eds). (2015). Estructuras y funciones de la célula microbiana. En: Brock. *Biología de los microorganismos*, pp: 27-76. Pearson Educación S.A, España.

Madigan, M. T., Martinko, J. M., Bender, K. S., Buckley, D. H y Stahl, D. A. (2015). Crecimiento y Control Microbiano. En: Brock. *Biología de los microorganismos*, pp: 149-183. Pearson Educación S. A, España.

Manod, J. (2010). What is *E. coli*?. En: Manning, S. D (ed). *Escherichia coli* infections, pp: 16-25, David Heymann, USA.

Moghimi, R., Ghaderi, L., Rafati, H., Aliahmadi, A y Mc Clements, D. J. (2016). Superior antibacterial activity of nanoemulsion of *Thymus daenensis* essential oil against *E. coli*. *Food Chemistry*, 194, pp: 410-415.

Naber, C. K. (2009). *Staphylococcus aureus* Bacteremia: Epidemiology, Pathophysiology, and Management Strategies. *Clinical Infectious Diseases*, 48(s4), S231-S237.

Nataro, J y Kaper, J. (1998). Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology Reviews*, 11(1), pp: 142-201.

Nazzaro, F., Fratianni, F., Coppola, R y Feo, V. D. (2017). Essential Oils and Antifungal Activity. *Pharmaceuticals*, 10(4), pp: 86-106.

Noris, M. (2005). Hemolytic Uremic Syndrome. *Journal of the American Society of Nephrology*, 16(4), pp: 1035-1050.

Pandey, A. K., Kumar, P., Singh, P., Tripathi, N. N y Bajpai, V. K. (2017). Essential Oils: Sources of Antimicrobials and Food Preservatives. *Frontiers in Microbiology*, 7 (Art. 2161), pp: 01-14.

Pang, Z., Raudonis, R., Glick, B. R., Lin, T. J y Cheng, Z. (2019). Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and alternative therapeutic strategies. *Biotechnology Advances*, 39(1), pp: 177-192.

Percival, S. L y Williams, D. W. (2014). *Mycobacterium*. En: Percival, S.L., Yates, M. V., Williams, D. W., Chalmers, R. M y Gray, N. F (eds), pp: 177-207. *Microbiology of Waterborne Diseases*, Academic Press, U.K.

Prescott, M., Harley, J. P y Donald, A. K. (eds). (2004). Estructura y función de la célula procariota. En: *Microbiología*, pp: 44-77. MCGRAW-HILL / INTERAMERICANA, España.

Pušárová, A., Bučková, M., Kraková, L., Pangallo, D y Kozics, K. (2017). The antibacterial and antifungal activity of six essential oils and their cyto/genotoxicity to human HEL 12469 cells. *Scientific Reports*, 7(1), pp: 8211-8222.

Scroth, M. N., Hildebrand, D. C. y Panopoulos, N. J. (2006). Phytopathogenic *pseudomonads* and related plant-associated *Pseudomonas*. En: Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K. H y Stackebrandt, E (eds). *The Prokaryotes*, pp: 714-740, Springer, USA.

Severino, P., Resende Diniz Acioli, F., Cardoso Cordeiro, J., Céu Teixeira, M., Santini, A., Kovačević, A. B y Souto, E. B. (2018). Essential oils with antimicrobial properties formulated in lipid nanoparticles. En: Rai, M., Zacchino, S y Derita, M. G. (eds). *Essential*

oils and nanotechnology for treatment of microbial diseases, pp: 3-13. CRS Press Taylor & Francis Group, USA.

Rogers, K. (ed). (2011). Anatomy of the eye. En: *The eye, the physiology of human perception (The Human Body)*, pp: 17-49. Britanica Educational Publishing y Rosen Educational Services, LLC, USA.

Rosin, L. M y Bell, N. P. (2013). Preservative toxicity in glaucoma medication: clinical evaluation of benzalkonium chloride-free 0,5% timolol eye drops. *Clinical Ophthalmology*, 7, pp: 2131-2135.

Salvia-Trujillo, L., Rojas-Graw, A., Soliva-Fortuny, R y Martín Belloso, O. (2015). Physicochemical characterization and antimicrobial activity of food-grade emulsions and nanoemulsions incorporating essential oils. *Food Hydrocolloids*, 43, pp: 547-556.

Stapleton, F., Keay, L., Sanfilippo, P. G., Katiyar, S., Edwards, K. P y Naduvilath, T. (2007). Relationship between Climate, Disease Severity, and Causative Organism for Contact Lens-Associated Microbial Keratitis in Australia. *American Journal of Ophthalmology*, 144(5), pp: 690-698.

Sutton, S. V. W y Porter, D. (2002). Development of the antimicrobial effectiveness test as USP chapter <51>. *PDA journal of pharmaceutical science and technology*, 56(6), pp: 300-311.

Thygesen, J. (2018). Glaucoma therapy: preservative-free for all?. *Clinical Ophthalmology*, 12, pp: 707-717.

Tortora, G. J., Funke, B. R y Case, C. L. (ed). (2007). Anatomía funcional de las células procariotas y eucariotas. En: *Introducción a la Microbiología*, pp: 77-112. Editorial Médica Panamericana, España.

USP 34 (2011).

Wong, V. W. Y., Lai, T. Y. Y., Chi, S. C. C., y Lam, D. S. C. (2011). Pediatric Ocular Surface Infections: A 5-year Review of Demographics, Clinical Features, Risk Factors, Microbiological Results, and Treatment. *Cornea*, 30(9), pp: 995-1002.

CAPÍTULO IV: APLICACIÓN DE MICROEMULSIONES EN EL CONTROL DE INSECTOS PLAGA.

INTRODUCCIÓN

ARTRÓPODOS: GENERALIDADES

Los artrópodos son animales invertebrados, de cuerpo segmentado y simetría bilateral. Poseen exoesqueleto quitinoso que los protege del medio externo y al mismo tiempo brinda inserción a la musculatura interior. El esqueleto externo al ser rígido no permite el crecimiento por lo que el animal se desprende de él en un proceso, controlado hormonalmente, de ecdisis o muda.

Los artrópodos poseen apéndices articulados pares, adaptados para obtener el alimento, caminar, nadar, defenderse, etc. Constituyen el filo más diverso de los metazoos (animales pluricelulares), siendo más de un millón las especies descritas (Pérez-Arellano et al, 2010).

El *Phylum* se divide en los *Subphylum Hexapoda, Crustacea, Miriapoda y Chelicerata* (Koenemann et al, 2010).

Los artrópodos de interés sanitario, corresponden principalmente a las *Clases Insecta y Chelicerata*. En general, pueden ser considerados como parásitos (ej: piojos); como ponzoñosos (ej: arañas); como alergizantes (ej: avispas, orugas) y pudiendo actuar como agentes transmisores o vectores (ej.: vinchucas, mosquitos) (Goddard, 2008).

IMPORTANCIA SANITARIA DE LA FAMILIALIA CULICIDAE (MOSQUITOS):

Los **artrópodos** capaces de transmitir organismos patógenos a hospedadores vertebrados susceptibles, se denominan vectores (Goddard, 2008). Pueden clasificarse en: mecánicos y biológicos.

En el caso particular de los vectores mecánicos, el agente transmitido no evoluciona ni se multiplica y la asociación patógeno-vector es inespecífica. El vector mecánico es un transportador no indispensable para la sobrevivencia del agente patógeno y no funciona como la principal vía de transmisión del mismo.

Sin embargo, en los vectores biológicos, el artrópodo cumple un rol fundamental para el mantenimiento del patógeno. El agente transmitido se multiplica o evoluciona en el insecto. La asociación patógeno-vector es específica e indispensable para la

sobrevida del agente patógeno. El vector biológico, en este caso, funciona como la vía principal de transmisión de la enfermedad (*Chamberlain y Sudia, 1961*).

Clasificación: - *Subphylum Hexapoda*

- *Clase Insecta*
- *Orden Diptera*

En este apartado, nos referiremos particularmente al Orden Díptera. Los organismos de este orden se caracterizan por poseer un solo par de alas membranoso (di: dos ptera: alas), el segundo par está transformado en balancines o halterios.

Entre los dípteros, se encuentran las moscas, mosquitos y tábanos (*Betancourt y Scantoni, 2009; Bergilos Gasion y Rivas-Fernández*).

La importancia del conocimiento de los dípteros, reside en el potencial daño que pueden ocasionar sobre la salud humana. Las especies hematófagas suelen ser perjudiciales para el hombre y animales domésticos. En este sentido, se destacan los mosquitos, capaces de transmitir enfermedades tales como el paludismo, dengue, fiebre amarilla y filariasis, entre otras (*Betancourt y Scantoni, 2009; Manguin, Mouchet y Carnavale, 2011*).

Existen más de 3.400 especies de mosquitos agrupadas en el suborden *Nematocera* y pertenecientes a 37 géneros, que conforman una única familia: *Culicidae*, la cual se divide a su vez en 3 subfamilias: (1) *Toxorynchitinae*, (2) *Anophenilae*, (3) *Culicinae*.

Los mosquitos más importantes que actúan como vectores para la transmisión de enfermedades son los correspondientes a los géneros: *Anopheles*, *Culex*, *Aedes*, *Mansonia*, *Haemagogus* y *Sabethes* (*Manguin, Mouchet y Carnavale, 2011*).

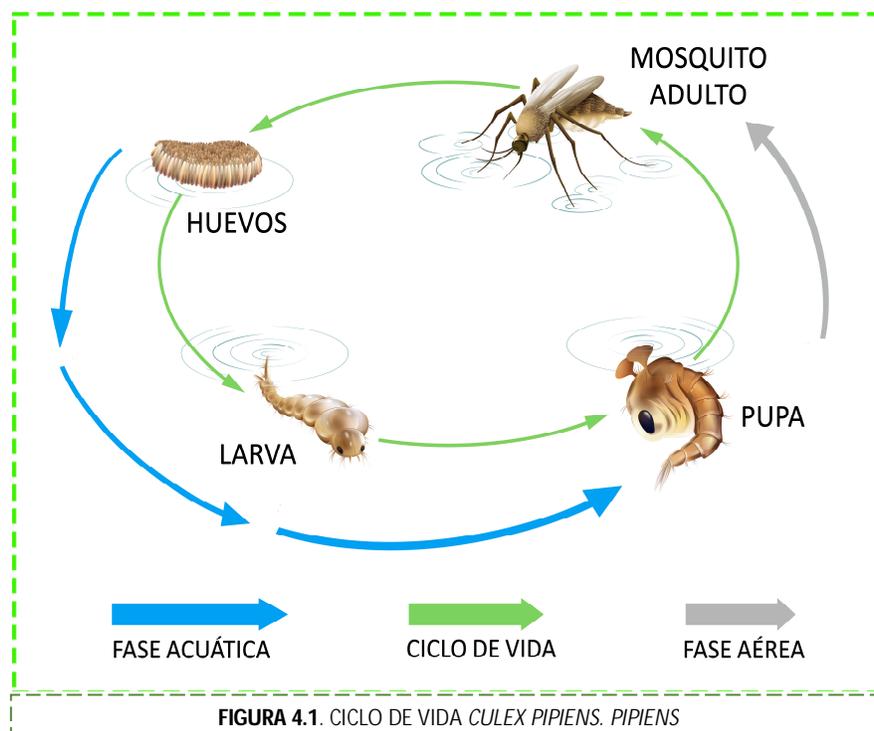
Particularmente, el género *Culex* incluye un gran número de especies (cerca de 770) distribuidas en todas las regiones geográficas. Actualmente, en Argentina se registran 77 especies organizadas en ocho subgéneros; los más representados son *Melanoconion* y *Culex*, con 33 y 29 especies respectivamente (*Almiron, 2005*).

Las especies correspondientes al género *Culex* se encuentran en toda la Argentina, a excepción de Tierra del Fuego, siendo algunas de ellas responsables de transmitir microfilarias y arbovirus.

Culex pipiens incluye un conjunto de subespecies *Culex pipiens pipiens*, *Culex pipiens quinquefasciatus*. La primera se encuentra en zonas frías y templadas (desde Buenos Aires hacia el sur) y la segunda en zonas tropicales y subtropicales principalmente (centro y norte del país) (Almiron, 2005).

Particularmente, este trabajo se centrará en *Culex pipiens pipiens*, por tratarse de la especie más abundante en la región de Bahía Blanca.

BIOLOGÍA GENERAL: *CULEX PIPENS. PIPENS*



C. p. pipiens presenta una metamorfosis completa en la que la forma juvenil pasa por las fases de larva y de pupa antes de convertirse en adulto. La larva es anatómica y fisiológicamente diferente al adulto, siendo sus hábitats y sus apetencias tróficas totalmente distintas.

Como todos los dípteros, los mosquitos pasan por cuatro estados durante su ciclo biológico: huevo – larva (4 estadios evolutivos: L1-L4) – pupa – adulto, véase Figura 4.1. Los estados inmaduros (huevo, larva y pupa) son acuáticos, en tanto que el adulto es de vida terrestre-aérea (Manguin, Mouchet y Carnavale, 2011).

FASE ACUÁTICA:**HUEVOS:**

Los huevos son ovoides y miden en general, 0,5 mm. En el caso particular del género *Culex*, se depositan sobre la superficie acuática y flotan a través de cámaras aéreas apicales.

Una hembra coloca entre 250 a 400 huevos luego de ingerir sangre, pudiendo realizar varias ingestas a lo largo de su vida (dos semanas a un mes) y depositar en consecuencia una cantidad importante de huevos (Almiron, 2005; Clemments, 1963).

Durante la oviposición, las hembras *Culex* se paran en la superficie del agua con las patas traseras en una posición en forma de V, véase Figura 4.2. Los huevos se liberan a través de la apertura genital y se agrupan entre formando una balsa donde quedan posicionados verticalmente con sus polos anteriores unidos por protuberancias coriónicas, véase Figura 4.3 (Becker et al, 2010; Dyar, 1902; Foster y Walker, 2019).

**FIGURA 4.2: OVOPOSICIÓN.****FIGURA 4.3: HUEVOS DE MOSQUITOS**

LARVA

La larva que emerge del huevo pasa por 4 estadios (L1, L2, L3, L4) a través de cuatro mudas que le permiten crecer desde 1 mm (L1) hasta 15 mm (L4) (*Manguin, Mouchet y Carnavale, 2011*).

En cada muda, la cabeza adquiere un tamaño característico, siendo este un buen indicador morfométrico del estadio larval. No obstante, las larvas de los cuatro estadios presentan una morfología general comparable (*Becker et al, 2010*).

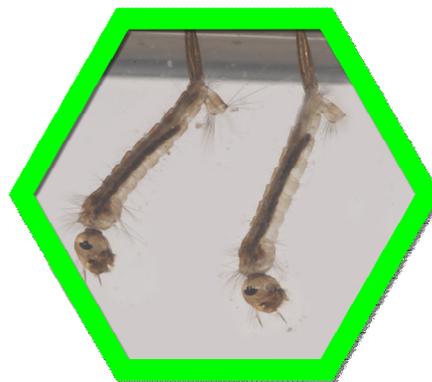


FIGURA 4.4: LARVAS *CULEX*: POSICIÓN ADOPTADA EN SUPERFICIE ACUÁTICA.

ANATOMÍA

El cuerpo de la larva se divide en tres partes distintas: (a) la cabeza con aparato bucal, ojos y antenas; (b) el tórax más amplio y (c) el abdomen que se compone de siete segmentos casi idénticos y tres segmentos posteriores modificados que llevan cuatro papilas anales para regular los niveles de electrolito.

Los culícidos, en el segmento abdominal VIII (dorsalmente proyectado) presentan un sifón respiratorio con espiráculos para el consumo de oxígeno (*Becker et al, 2010; Merrit y Wallace, 2003*). Este, les permite adoptar una posición angular en donde la cabeza se encuentra hacia abajo (*Becker et al, 2010; Lehane 2005*), véase Figura 4.4.

Tras la eclosión, las larvas jóvenes están totalmente preparadas para subsistir en la columna de agua. Dos factores son fundamentales para la subsistencia: el consumo de oxígeno atmosférico durante la respiración y la ingesta de partículas suspendidas o diluidas en el medio (*Clements, 1992*).

Respecto a la respiración, las larvas de mosquito, requieren de oxígeno atmosférico para poder vivir. Es por eso que pasan gran parte de su vida en la interfase agua-aire.

Se han descrito cuatro formas de respiración: respiración atmosférica, respiración cuticular, respiración por branquias compresibles y respiración vegetal (*Clements, 1992*). De todas ellas, la respiración cuticular es la forma más extendida y común a casi

todas las especies. El resto pueden ser utilizados como complemento en determinadas situaciones de inmersión.

En cuanto a la alimentación, las larvas en general ingieren invertebrados, protozoos y detritus. El modo de obtención de estos alimentos permite clasificarlas en filtradoras, recolectoras, ramoneadoras, trituradoras y depredadoras.

Acorde a su comportamiento alimenticio, las larvas de *Culex* se clasifican como filtradoras. Así, una vez “ancladas” en la superficie, mediante el movimiento de estructuras especializadas denominadas cepillos bucales, generan corrientes de agua que llevan las partículas del alimento en suspensión hacia la cavidad preoral (Dahl, Widahl y Nilsson, 1988; Foster y Walker, 2019; Lehane, 2005).

Aunque la mayoría de los reportes bibliográficos sugieren para las larvas ingesta indiscriminada, ciertos estudios de laboratorio indican que ingieren partículas de limitado tamaño. Esta selección puede ser consecuencia de: la forma y textura de las partículas, adaptaciones morfológicas y conductuales para la adquisición de alimentos, y características específicas del estado larvario.

En su mayoría, las larvas, ingieren material particulado que varía desde el tamaño coloidal hasta los 50 μm , siendo superior la ingesta de partículas de menor tamaño (Merrit, Dadd y Walker, 1992).

Entre los factores que condicionan la ingestión de agua están el peso de la larva, la salinidad del medio y la cantidad de alimento disponible. Los dos primeros muestran una correlación positiva con el grado de ingesta. De esta forma, las larvas de mayor tamaño, en estado más avanzado y presentes en sitios de elevada salinidad consumen un mayor volumen de agua que aquellas menos avanzadas, más pequeñas y que habitan biotopos de agua dulce (Becker et al, 2010).

Los adultos y las larvas en cuarto estadio son las fases más empleadas para estudios de laboratorio ya que han sido exhaustivamente investigadas y se posee un gran conocimiento en lo que a estructura anatómica y quetotaxia se refiere, lo que se traduce en una mayor disponibilidad de claves de identificación.

La determinación taxonómica de los insectos estuvo a cargo del personal del laboratorio de Zoología de Invertebrados II, Dpto de BBF, UNS.

PUPAS

Luego del huevo y la larva, la pupa es la tercera fase de desarrollo y la última que tiene lugar en el medio acuático.

Las pupas, presentan forma de coma, en donde la cabeza y el tórax se fusionan para formar un cefalotórax prominente. Desde el mesotórax dorsal, se proyectan un par de tubos o trompetas respiratorias, que le permiten a la pupa obtener oxígeno desde la superficie acuática.

En el interior de cefalotórax, se encuentran (por lo general, ventralmente enrollados) los apéndices en desarrollo de la cabeza y tórax del adulto, los cuales rodean un espacio de aire localizado ventralmente, que proporciona flotabilidad ayudando a mantener a la pupa en la superficie del agua durante su descanso.

Por otro lado, el abdomen que termina en 2 paletas natatorias, se mantiene flexionado por debajo del cefalotórax y actúa como un órgano propulsor cuando la pupa resulta perturbada (*Foster y Walker, 2019*), véase Figura 4.5.

En estado de reposo, la pupa se mantiene inmóvil quedando expuesta a la superficie acuática la porción terminal de las trompetas y las setas correspondientes al primer segmento abdominal (*Becker et al, 2010*).

Por lo general, esta fase se entiende como un periodo de transición entre la larva y el adulto, carente de alimentación (forma áfaga). Es una etapa sin estadios o fases intermedias de desarrollo donde se prioriza el ahorro energético, pues en ella se van a producir cambios fisiológicos y estructurales de elevado coste energético encaminados hacia la formación y la emergencia del adulto (*Merrit y Wallace, 2003; Lehane, 2005*).

La falta de necesidad asociada a la búsqueda de alimentos le posibilita a las pupas pasar la mayor parte del tiempo suspendida en la película superficial sin efectuar mayores movimientos. Sólo abandonan esta posición al ser perturbadas, en cuyo caso, la velocidad y explosividad de sus desplazamientos se debe a los músculos abdominales



FIGURA 4.5: PUPA

y a las aletas natatorias que en conjunto actúan como órgano propulsor (López Sánchez, 1989).

Las pupas resisten mejor que las larvas la desecación y los tratamientos químicos insecticidas que actúan por contacto gracias a que su doble cutícula las aísla del medio externo (Bueno Marí, 2010). No obstante, soportan en menor medida los cambios térmicos (López Sánchez, 1989).

Por otra parte, son totalmente inmunes a los tratamientos insecticidas, ya que éstos actúan por ingestión; sólo aquéllos que provoquen un descenso de la tensión superficial del agua pueden ocasionar la muerte de las pupas por asfixia (Bueno Marí, 2010).

FASE AÉREA

ADULTOS

Los adultos machos tienden a emerger antes que las hembras, debido a sus períodos de crecimiento larvario más cortos. Cuando el adulto se acerca la emergencia, la pupa permanece estacionaria en la superficie del agua y el abdomen se endereza gradualmente durante 10-15 min. El adulto sale desde la cutícula pupal al ingerir aire, lo que genera la división del cefalotórax con la consecuente emergencia y posicionamiento sobre la superficie acuática hasta que las alas se secan completamente, se endurecen y se preparan para iniciar el vuelo.

Los adultos de ambos sexos se alimentan de jugos de las plantas, pero sólo la hembra es hematófaga (Foster y Walker, 2019).

IMPORTANCIA DE *C.P.PIPIENS* EN LA SALUD POBLACIONAL

Los mosquitos pueden afectar la salud del hombre en forma directa ocasionando molestias por inoculación de sustancias irritantes presentes en la saliva (picaduras) o en forma indirecta al actuar como transmisores de agentes patógenos.

ACCIÓN DIRECTA

La saliva del mosquito, contiene diversos materiales biológicos (factores anticoagulantes, antiagregantes y vasodilatadores, sustancias que afectan la transmisión de parásitos de vectores artrópodos, enzimas relacionadas con la ingestión

de azúcar, lisozimas que controlan el crecimiento bacteriano e inmunomoduladores; la mayoría de estas últimas sustancias se han identificado como alérgenos. De este modo, tras la picadura de mosquito, se produce una pápula pruriginosa seguida de eritema o hincazón. Estas lesiones por lo general son fugaces, persistiendo desde varias horas hasta 2-3 días (como máximo) (Bergillos Gasion y Rivas-Fernández, 2006). No obstante, pueden también tener lugar respuestas tóxicas desarrolladas a nivel sistémico (Durden, 2019).

ACCIÓN INDIRECTA

Transmisión de agentes patógenos: el vector biológico *C.p.pipiens*, está asociado a la transmisión de filariasis linfática (*Wuchereria Bancrofti*).

Se denomina filariasis a un grupo de enfermedades producidas por parásitos, generalmente tropicales, (nematodos) que se transmiten en forma de larva a los vertebrados mediante la picadura de mosquitos (*Culex*, *Mansonia*, *Aedes* e incluso *Anopheles*). Tres parásitos causan filariasis linfática humana: *Wuchereria bancrofti*, *Brugia malayi* y *B. timori*, pero es particularmente *W. Bancrofti* responsable de más del 90% de las infecciones a nivel mundial (Joshi, 2018).

Esta enfermedad infecciosa afecta al tejido linfático y la piel produciendo gran invalidez (hipertrofia anormal de algunas partes del cuerpo, dolor y discapacidad grave) problemas sanitarios y grandes pérdidas económicas en los individuos y comunidades afectadas (Katiyar y Singh, 2011).

Los cuadros clínicos en las regiones de filariasis endémica pueden ser:

- 1) la forma asintomática y con estudios de parasitología negativos
- 2) microfilaremia asintomática
- 2) fiebre elevada, linfadenitis aguda recurrente y linfangitis retrógrada, con o sin microfilaremia
- 4) linfostasis acompañada de signos crónicos (hidrocele, quiluria y elefantiasis de las extremidades, mamas y genitales y
- 5) síndrome de eosinofilia pulmonar tropical (asma paroxística nocturna, neumopatía intersticial

crónica, fiebre ligera y recurrente, eosinofilia intensa y microfilarias en degeneración en los tejidos pulmonares, pero no en el torrente sanguíneo (filariasis oculta) (Heymann, 2005).

Para (a) prevenir la aparición de enfermedades (b) suprimir epidemias o (c) reducir las enfermedades endémicas ya existentes, el método de control del vector debería estar dirigido a la eliminación de la población de adultos, larvas o pupas (WHO, 1982).

El control de las poblaciones de mosquitos en los estados inmaduros resulta a menudo ventajoso dado que las larvas por lo general se encuentran concentradas, relativamente inmóviles, ocupando un mínimo espacio en comparación con los adultos, que suelen dispersarse rápidamente invadiendo extensas áreas. De este modo, una reducción efectiva en el número de larvas minimiza el uso de adulticidas y sus riesgos, lo cual resulta beneficioso para el ambiente y saludable para la población en general (Killeen, Fillinger y Knols, 2002; Sugumar et al, 2014).

A nivel mundial, el control de mosquitos se basa en el empleo de insecticidas sintéticos, con efectos neurotóxicos. En nuestro país, los organofosforados y piretroides son el método más común para el manejo de adultos y larvas respectivamente

Aunque el uso de insecticidas de síntesis o químicos fue y sigue siendo el más extendido en el control de insectos plaga, el empleo de estos agentes ha generado efectos deletéreos, como el desarrollo de poblaciones resistentes y problemas ambientales (Cuervo - Parra; Cortés y Ramirez-Lepe, 2016).

La resistencia a insecticidas o resistencia fisiológica surge como consecuencia de una fuerte presión de selección direccionada sobre una población resultante de la utilización intensiva y repetida de un producto tóxico. Se define además, como la capacidad de una población de insectos de tolerar dosis de insecticidas que serían letales para la mayoría de los individuos en una población normal de la misma especie siendo el resultado de una selección positiva ejercida, por el insecticida, sobre genes inicialmente en baja frecuencia. Los genes de resistencia pueden dispersarse en la población local de insectos e incluso a nivel mundial (WHO, 1975).

Los dos principales mecanismos de resistencia a insecticidas son alteraciones en el sitio blanco y un incremento en la tasa de decodificación de los insecticidas.

Se proponen también mecanismos basados en la disminución de la permeación, aumentos en las tasas de excreción y cambios en el comportamiento que eviten el contacto vector - insecticida (aún siendo los vectores sensibles a estos agentes) (Brogdon y Mc Allister, 1998, Dang et al, 2017).

La resistencia mediada por el sitio blanco ocurre cuando el insecticida no logra fijarse al sitio de acción debido a una disminución en la sensibilidad o alteraciones en el mismo.

La resistencia basada en las enzimas detoxificantes se presenta cuando niveles elevados de las mismas o modificaciones en sus actividades, contribuyen a disminuir la dosis efectiva de un insecticida evitando que llegue a su sitio de acción. Se ha encontrado, en especies *Culex*, altos niveles de resistencia a organofosforados, debido al aumento de esterasas (Liu, 2015; Wang, 2000; Cui et al, 2006) y a piretroides originados a partir de un incremento en la enzima citocromo p450 (Chang et al, 2016; Feyereisen, 1999; Poupardin et al, 2008; Komgata, Ksai y Tomita, 2010; Liu, 2015).

Hoy en día, los insecticidas sintéticos funcionan como herramienta para el control de insectos. Sin embargo, la aplicación indiscriminada contribuyó a la contaminación ambiental, ocasionando efectos negativos sobre organismos no blancos y desarrollo de resistencia en los insectos plaga (Chellapandian et al, 2018). Por lo anteriormente expuesto, se requiere el desarrollo formulaciones basadas en compuestos fitosanitarios.

Los metabolitos secundarios de origen vegetal, constituyen una buena alternativa al ejercer un potente efecto insecticida y poseer reducida toxicidad y actividad neurotóxica nula en mamíferos, disminuida persistencia en el medio, bajo costo, biodegradabilidad así como especificidad sobre insectos a través del contacto y/o mediante efecto fumigante. De este modo, las moléculas orgánicas de origen botánico constituyen una fuente segura de compuestos para el manejo de las plagas, no desarrollando impacto negativo sobre el medio ambiente y representando una excelente opción respecto de los insecticidas sintéticos persistentes (Ahn et al, 2006; Misra y Pavlostathis, 1997; Batish et al 2007; Isman, 2000; Jesser et al, 2018, Cespedes et al, 2006).

Por su parte, en lo referente al fenómeno de resistencia, se ha encontrado que los aceites esenciales son particularmente útiles frente a insectos que han desarrollado esta característica.

A diferencia de los pesticidas sintéticos de uso convencional basados en un único componente, los aceites esenciales están constituidos por asociaciones complejas de compuestos que actúan de modo sinérgico generando una defensa estratégica, capaz de dificultar el desarrollo de resistencia en las plagas (*Coats, 1994; Faleiro y Miguel, 2013; Isman, 1997*).

Además, debido a los múltiples blancos sobre los cuales el aceite esencial puede actuar, la resistencia en insectos se desarrolla mucho más lentamente que con los insecticidas químicos tradicionales (*Isman y Machial, 2006*).

Finalmente, si bien no es abundante la información disponible sobre el mecanismo de acción de los aceites esenciales en los insectos, ciertos aceites o sus constituyentes producen síntomas específicos que permitirían deducir neurotoxicidad en insectos (*Kostyukovsky et al, 2002; Isman, 2006*). Algunas investigaciones indican que ciertos aceites esenciales y, en particular, los monoterpenos actúan sobre los receptores de la octopamina, lo cual los convierte en productos altamente selectivos dado que este tipo de receptores no está presente en los vertebrados. De esta manera, el sistema octopaminérgico presente en los insectos se convierte en un blanco biorracional para su control (*Enan, 2005; Price y Berry, 2006; Jankowska et al, 2018*).

Cabe destacar que, la composición química de un determinado aceite esencial puede variar en diferentes ejemplares de la misma especie vegetal, e inclusive en los diferentes órganos de la misma planta, como resultado de su propia fisiología, o debido al clima y a las condiciones del suelo (*Sasson, Ruso y Toledano, 2007*).

Así, el perfil químico de un aceite natural, normalmente se modifica como resultado de variaciones en los factores externos, por lo que surgen grandes dificultades al momento de estandarizar la composición de los productos de origen natural (*Lorenz et al, 2013*).

Además, el uso de extractos de origen vegetal en los programas destinados al control de vectores, se ve limitado como resultado de los elevados costos de producción no pudiendo emplearse este tipo de productos en países en desarrollo, donde justamente las enfermedades transmitidas por vectores son más frecuentes.

Los extractos de plantas sintetizados artificialmente se muestran, sin dudas, como una alternativa económicamente viable y más segura respecto de los larvicidas/insecticidas químicos.

Lo anteriormente expuesto justifica el empleo de aceites sintéticos de uso comercial para la fabricación de fórmulas nanométricas con actividad larvicida.

FORMULACIÓN DE ACEITES ESENCIALES

Los aceites esenciales podrían constituir un método complementario o alternativo para el manejo integrado de plagas en varios aspectos ya que consisten en mezclas de una gran variedad de compuestos bioactivos (alcoholes, aldehídos, cetonas, ésteres, fenoles aromáticos y lactonas, así como monoterpenos y sesquiterpenos). No obstante, la elevada volatilidad, baja solubilidad en agua y la tendencia a la oxidación limitan el empleo de estos aceites como un sistema alternativo para el control de plagas (*Moretti et al, 2002*).

La reducida solubilidad acuosa intrínseca, constituye sin dudas, un desafío tecnológico en lo referente a la fabricación de productos pesticidas acuosos. Referido a esto, en los últimos años, se han llevado a cabo numerosos estudios para el desarrollo de nuevas formulaciones larvicidas empleando nanotecnología (*Botas et al, 2017*).

La nanoformulación de los aceites esenciales podría resolver estos problemas, protegiéndolos de la degradación y las pérdidas por evaporación, logrando una liberación controlada y facilitando la manipulación por parte del operador (*Moretti et al, 2002*).

Una alternativa muy atractiva para la formulación de agroquímicos es utilizar sistemas del tipo microemulsión. Como se mencionó en capítulos anteriores, estos son dispersiones ópticamente isotrópicos y termodinámicamente estables que ofrecen una serie de ventajas sobre las emulsiones o/w, por las siguientes razones:

- 1)** una vez que la composición de la microemulsión ha sido identificada, el sistema se prepara simplemente mezclando todos los componentes sin la necesidad de aporte energético apreciable.

- 2) debido a su estabilidad termodinámica, estas formulaciones no sufren separación ni descomposición en almacenamiento (dentro de un cierto rango de temperatura, dependiendo del sistema). Asimismo, no requieren de controles rigurosos que aseguren la estabilidad física durante su aplicación.
- 3) la baja viscosidad de los sistemas de microemulsión promueve facilidad de vertido y dispersión en la dilución quedando escasos/nulos residuos en el recipiente.
- 4) posible mejora de la eficacia biológica de muchos agroquímicos, debido a la solubilización del pesticida en la fase interna de la microemulsión (*Tadros, 2009*).

Por lo anteriormente expuesto, dentro de los grandes beneficios de las nanoformulaciones/microemulsiones se encuentran: el incremento en la eficacia debido al aumento del área superficial, mayor solubilidad del aceite y pesticidas hidrofóbicos en medio acuoso, inducción de actividad sistémica debido al reducido tamaño particular y disminución de la toxicidad debido a la ausencia de disolventes orgánicos en la fórmula (*Kah et al, 2013*). De este modo, los productos de estructura nanométrica anteriormente mencionados, se consideran una excelente opción desde el punto de vista ecológico, económico y eficacia, en comparación con las macroemulsiones, suspensiones y demás formulas convencionales basadas en pesticidas sintéticos. Lo anteriormente descrito argumenta el desarrollo de microemulsiones como formulas larvicidas destinadas al control de insectos plaga.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

- Generar una formulación larvicida basada en microemulsiones acuosas (aceite en agua, o/w), constituidas por aceite esencial de geranio (Ger) y su principal componente activo: geraniol (GOH).

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Evaluar la actividad tóxica aguda y residualidad de las microemulsiones de geranio y geraniol en larvas.
- Evaluar la actividad tóxica aguda de las microemulsiones en pupas.

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES

Surfactantes: Brij 35, Tween 80, Cremophor EI (Sigma Aldrich). Fases internas: Aceite esencial de geranio Swiss-Just, fabricado bajo supervisión y control de Ulrich Jüstrich AG, Walzenhausen, Suiza; Geraniol (Sigma Aldrich). Fase externa: Agua bidestilada.

INSECTOS

Las larvas de mosquitos fueron recolectadas en una zona de agua estancada. La identificación de especies se realizó en el Laboratorio de Zoología Invertebrados II, UNS, Argentina. Se identificaron como *C. pipiens pipiens* y fueron mantenidas en condiciones de temperatura adecuadas para la aclimatación.

MÉTODOS

DYNAMIC LIGHT SCATTERING (DLS)

El tamaño de la fase interna así como el índice de polidispersión fue analizado utilizando un instrumento nano ZEN 3690 modelo Zetasizer (Malvern, Reino Unido). Cada medición se llevó a cabo a temperatura ambiente por triplicado.

MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN

La morfología de las microemulsiones se determinó por Microscopía Electrónica. Una gota de la dilución de la muestra, fue transferida sobre una rejilla de cobre recubierta de carbono, seguido de tinción negativa con una solución de acetato de uranilo durante 1 min.

Después la réplica se secó a temperatura ambiente, la imagen se visualizó con un microscopio electrónico JEOL 100 CX-II (JEOL, Akishima, Tokyo, Japón), en el Centro Científico y Tecnológico CONICET-Bahía Blanca.

ACTIVIDAD LARVICIDA AGUDA

Los bioensayos se realizaron conforme a las normativas WHO (1996) utilizando larvas de *C. pipiens pipiens* de estadio IV.

Se emplearon recipientes plásticos que contenían 80 ml de agua. En cada uno de ellos, se agregaron las fórmulas a testear (microemulsiones/emulsiones de aceite esencial de geranio y geraniol) logrando una serie de concentraciones de principio activo (aceite esencial o monoterpeno) que comprendía el intervalo correspondiente a 10 - 130 ppm. A fin de analizar el efecto de las formulaciones sobre la actividad insecticida se estudió la bioactividad del aceite esencial de geranio y del geraniol en el mismo intervalo de concentraciones.

Como control se utilizó agua de grifo y la solución micelar a una concentración de surfactantes equivalente a la de las fórmulas a ensayar.

En cada uno de los recipientes (tratamientos y controles) se agregaron veinte larvas y se mantuvieron a 27 ± 2 °C y 60 - 70% de humedad relativa. Para cada tratamiento y control se realizaron 6 réplicas independientes.

Después de 24 h, se registró la mortalidad. Las larvas se consideraron muertas cuando no presentaron movimientos corporales frente al estímulo con una aguja.

Los datos de mortalidad fueron sometidos a un análisis probit con el fin de obtener la DL50 (dosis letal 50, dosis capaz de matar al 50% de la población) y DL99 (dosis letal 99, concentración de principio activo capaz de matar al 99% de la población ensayada) utilizando SPSS 15,0 (software estadístico). Los valores de DL50 se consideraron significativamente diferentes, si los intervalos de confianza (95%) no se solapaban.

ACTIVIDAD LARVICIDA RESIDUAL

Según Prophiro y sus colaboradores, el efecto residual se define como la capacidad de mantener la actividad larvicida para un organismo blanco dado, durante cierto período de tiempo.

Para estudiar el efecto residual de los productos se diluyeron en agua de grifo varias muestras de las emulsiones (GOH 70 y Ger 70), de las microemulsiones (GOH 20 y Ger 20) y de los principios activos no formulados (aceite de geranio y GOH), obteniendo una concentración final a la DL99.

Cada una de estas muestras se mantuvo en oscuridad a $27\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ y 60-70% de humedad relativa durante 28 días.

Durante este período de tiempo y a distintos intervalos, se evaluó el efecto larvicida de cada uno de los productos utilizando la metodología descrita anteriormente. Luego de 24 h se registró el porcentaje de mortalidad.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

CARACTERIZACIÓN DE MICROEMULSIONES

Conforme a los datos obtenidos de los diagramas de fase, la región de microemulsión para (Ger) fue superior al área correspondiente a las microemulsiones de GOH, véase capítulo I - Figuras: 1.17 y 1.18. Esto podría deberse a la presencia de diferentes potenciadores de solubilidad en el aceite esencial tales como, alcoholes de cadena corta (*Edris y Malone, 2012*) que pueden actuar como co-tensioactivos, reduciendo aún más la tensión interfacial y favoreciendo la partición entre las moléculas tensioactivas de la interfase generando un cambio en la curvatura de la región interfacial (*Sottmann y Stubenrauch, 2009*).

Con el fin de analizar la actividad biológica de las microemulsiones de (GOH) así como las formulaciones de (Ger), se prepararon 10 muestras, véase Tablas 4.1 y 4.2: cinco correspondían a microemulsiones (tres de (Ger) y dos basadas en (GOH)). Las restantes mezclas eran emulsiones de (Ger)/agua o (GOH)/agua, véase Tabla 4.1.

TABLA 4.1- COMPOSICIÓN, TAMAÑO Y CARACTERÍSTICAS MACROSCÓPICAS DE EMULSIONES Y MICROEMULSIONES DE ACEITE ESENCIAL DE GERANIO (Ger) Y GERANIOL (GOH).

NANOFORMULACIÓN	RELACIÓN ACEITE/MEZCLA DE SURFACTANTES CREMOPHOR EL- BRIJ 35- TWEEN 80 (1:1:2) (G)	DIÁMETRO (HM)	CARACTERÍSTICAS MACROSCÓPICAS
GOH 10%	1:9	8.2	MICROEMULSIÓN TRANSPARENTE
GOH 20%	2:8	10.1	MICROEMULSIÓN TRANSPARENTE
GOH 30%	3:7	154.1	EMULSIÓN TURBIA
GOH 35%	3.5 : 6.5	356.7	EMULSIÓN TURBIA
GOH 70%	7:3	482.6	EMULSIÓN LECHOSA
Ger 10%	1:9	9.9	MICROEMULSIÓN TRANSPARENTE
Ger 20%	2:8	11.1	MICROEMULSIÓN TRANSPARENTE
Ger 30%	3:7	13.8	MICROEMULSIÓN TRANSPARENTE
Ger 35%	3.5 : 6.5	186.1	EMULSIÓN TURBIA
Ger 70%	7:3	525.3	EMULSIÓN LECHOSA

NOTA: LOS VALORES 10, 20, 30, ETC, SE CORRESPONDEN AL PORCENTAJE DE FASE INTERNA EN LA MEZCLA SURFACTANTE/ACEITE, PREVIO A LA ADICIÓN DE LA FASE EXTERNA

TABLA 4.2 - COMPOSICIÓN (% P/P) DE LAS EMULSIONES Y MICROEMULSIONES DE GERANIOL (GOH) ACEITE DE GERANIO (Ger)

MUESTRAS	COMPOSICIÓN
GOH 10%	CREMOPHOR EL (2,67%) - BRIJ 35 (2,67%) - TWEEN 80 (5,34%) - GERANIOL (1,19%) - AGUA BIDEDESTILADA (88,13%)
GOH 20%	CREMOPHOR EL (2,38%) - BRIJ 35 (2,38%) - TWEEN 80 (4,76%) - GERANIOL (2,38%) - AGUA BIDEDESTILADA (88,1%)
GOH 30%	CREMOPHOR EL (2,11%) - BRIJ 35 (2,11%) - TWEEN 80 (4,14%) - GERANIOL (3,61%) - AGUA BIDEDESTILADA (88,03%)
GOH 35%	CREMOPHOR EL (1,94%) - BRIJ 35 (1,94%) - TWEEN 80 (3,88%) - GERANIOL (4,14%) - AGUA BIDEDESTILADA (88,10%)
GOH 70%	CREMOPHOR EL (0,88%) - BRIJ 35 (0,88%) - TWEEN 80 (1,76%) - GERANIOL (8,37%) - AGUA BIDEDESTILADA (88,11%)
Ger 10%	CREMOPHOR EL (2,67%) - BRIJ 35 (2,67%) - TWEEN 80 (5,34%) - GERANIO (1,19%) - AGUA BIDEDESTILADA (88,13%)
Ger 20%	CREMOPHOR EL (2,38%) - BRIJ 35 (2,38%) - TWEEN 80 (4,76%) - GERANIO (2,38%) - AGUA BIDEDESTILADA (88,1%)
Ger 30%	CREMOPHOR EL (2,11%) - BRIJ 35 (2,11%) - TWEEN 80 (4,14%) - GERANIO (3,61%) - AGUA BIDEDESTILADA (88,03%)
Ger 35%	CREMOPHOR EL (1,94%) - BRIJ 35 (1,94%) - TWEEN 80 (3,88%) - GERANIO (4,14%) - AGUA BIDEDESTILADA (88,10%)
Ger 70%	CREMOPHOR EL (0,88%) - BRIJ 35 (0,88%) - TWEEN 80 (1,76%) - GERANIO (8,37%) - AGUA BIDEDESTILADA (88,11%)

Se sabe que no existe relación directa entre el tamaño de las gotículas emulsionadas y las características fisicoquímicas de los tensioactivos usados (*Chayjana et al, 2010*); por lo que el diámetro particular más pequeño que se puede lograr es fundamentalmente una función de la composición total del sistema.

Las microemulsiones obtenidas en este trabajo incluyen una mezcla de tres tensioactivos no iónicos biocompatibles: un polisorbato (Tween 80), un éter de alquilo de polioxietileno (Brij 35) y un surfactante derivado polioxietilénico de aceite de ricino (Cremophor El).

El tamaño medio de partícula y la distribución de tamaño constituyeron los factores más importantes en el diseño de esta nueva formulación y rutinariamente uno de los primeros parámetros a medir.

La solubilidad y la velocidad de disolución dependen en gran medida del tamaño particular y, en consecuencia, determinan el rendimiento biológico, la estabilidad física y la vida útil del producto (aspectos que podrían mejorarse a menor tamaño particular) (*Sasson, Ruso y Toledano, 2007*). La distribución del tamaño se evaluó mediante el

análisis de los datos generados por DLS, también conocido como Espectroscopia de Correlación de Fotones, que permite medir diámetros que se encuentran en el rango de 3-3000 nm. DLS posibilita, además, la determinación del PDI (índice de polidispersión) que es una medida de la desviación estándar respecto del tamaño promedio de la gota (*Patel et al, 2009*). Valores de PDI de 0,1 a 0,25 indican una distribución de tamaño estrecha mientras que valores de $PDI > 0,5$ manifiestan una distribución muy amplia (*Sasson, Ruso y Toledano, 2007*).

El tamaño de las gotículas y las propiedades macroscópicas de los sistemas se muestran en la Tabla 4.1. En esta Tabla se puede observar que los tamaños más pequeños se lograron con la relación de aceite/tensioactivo más baja (1:9).

Referido a esto, cuando altas concentraciones de agentes tensioactivos se adsorben en la interfase resulta una tensión interfacial negativa y la energía se encuentra disponible para incrementar el área interfacial, con la consecuente reducción del tamaño de las gotículas (*Sottmann y Stubenrauch, 2009*). Así, las microemulsiones mostraron diámetros de fase dispersa que van desde 8 a 14 nm asociados a valores de PDI bajos ($<0,2$). Esto último, indicaría uniformidad en el tamaño de las gotículas pudiendo clasificarse las fórmulas como sistemas monodispersos.

Además de la gran estabilidad observada, respecto del resto de las formulaciones de mayor tamaño particular, se presume que las formulas de menor diámetro de gotícula tendrían una actividad larvícida más eficaz al aumentar el área superficial de la fase interna (oleosa/aceite esencial) la que actuaría en estos casos como principio activo otorgando a los sistemas características larvícidas.

Las propiedades macroscópicas detalladas en la Tabla 4.1 dependen básicamente, del tamaño de la fase interna y de su interacción con la luz solar. Cuando el diámetro fase dispersa es inferior a 20 nm se obtienen sistemas transparentes, de modo no se produjo ninguna interacción. Sin embargo a mayor diámetro, las partículas interactúan con la radiación generando, a nivel óptico, efectos de turbidez.

Las imágenes TEM de las microemulsiones de GOH 20 y Ger 20 se muestran en el capítulo I, véase Figuras 1.17 y 1.18. Como se puede observar las fotografías revelaron tamaños nanométricos, coincidentes con los resultados arrojados por DLS, presentando las muestras una morfología casi esférica, de distribución regular.

ACTIVIDAD INSECTICIDA

Uno de los mayores inconvenientes de la utilización de insecticidas químicos para el control de larvas de mosquitos es el potencial riesgo de contaminación ambiental y los efectos inespecíficos sobre otros organismos.

Se han llevado a cabo muchos estudios para identificar a los larvicidas más seguros (*ecológicamente amigables*) siendo buenos candidatos para este propósito los aceites esenciales por presentar potencial actividad ovicida, fumigante, reguladora del crecimiento de insectos, e insecticida frente a una gran variedad de especies (*Prajapati et al, 2005; Isman, 2000*). Las características físico-químicas de dichos aceites, les permiten interferir con el metabolismo basal, bioquímico, fisiológico y demás funciones asociadas al comportamiento de los insectos (*Kumar et al, 2011*). No obstante, como se mencionó anteriormente, la naturaleza lipófila hace que los larvicidas basados en aceites esenciales deban ser especialmente formulados para lograr aplicación efectiva en el medio acuático.

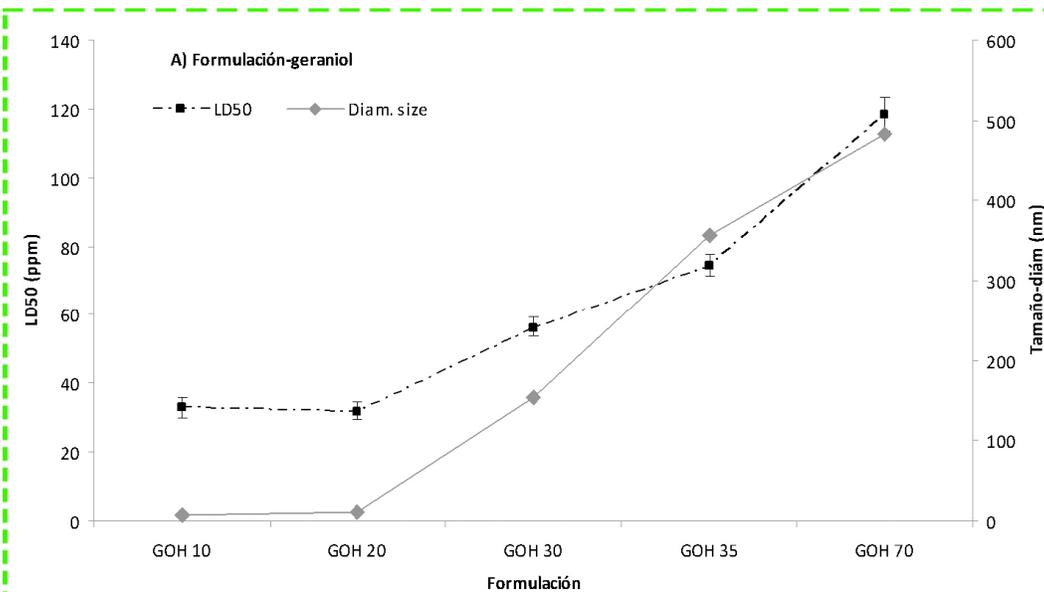
En este trabajo, se diseñaron microemulsiones acuosas capaces de dispersar los principios activos con potencial actividad larvicida (GOH y Ger) en agua y alcanzar elevada estabilidad tras la dilución una vez aplicados en el medio acuático.

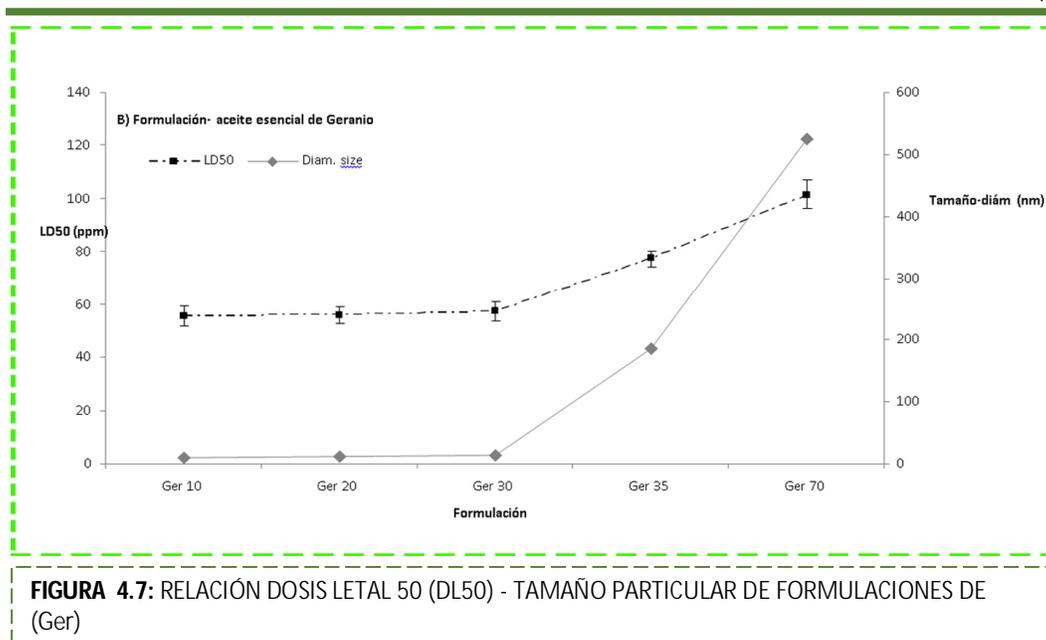
Además, las microemulsiones obtenidas están exentas de solventes tóxicos basándose particularmente en el empleo de tensioactivos carentes de efectos ecotoxicológicos, debido a los altos niveles de biodegradabilidad que presentan (*Balson y Felix, 1995*).

En la Tabla 4.3 se muestran los resultados de DL50 obtenidos, para las fórmulas (microemulsiones y emulsiones) basadas en GOH y Ger, 24 h después del tratamiento efectuado sobre larvas de *C. pipiens pipiens* en estadio IV.

TABLA 4.3: RELACIÓN DEL DIÁMETRO PARTICULAR CON LOS VALORES DE DL50 OBTENIDOS PARA LAS EMULSIONES Y MICROEMULSIONES DE GERANIO (Ger) Y GERANIOL (GOH).

FORMULACIÓN	DIÁMETRO (NM)	DL50	LIM. SUP	LIM. INF
GOH 10%	8,2	32,82	3	3
GOH 20%	10,1	31,63	3	2
GOH 30%	154,1	55,97	3,3	2
GOH 35%	356,7	74,42	3,1	3,3
GOH 70%	482,6	118,21	5,2	4,5
Ger 10%	9,9	55,24	4	3,5
Ger 20%	11,1	55,82	3	3
Ger 30%	13,8	57,32	3,6	3,9
Ger 35%	186	77,25	3,1	2,9
Ger 70%	525,3	101,5	5,6	5,1

**FIGURA 4.6:** RELACIÓN DOSIS LETAL 50 (DL50)-TAMAÑO PARTICULAR DE FORMULACIONES DE GOH TRAS 24 H DE EXPOSICIÓN SOBRE LARVAS CULEX.



Para las formulaciones GOH, los valores de la DL50 de la microemulsión se aproximaron a los 32 ppm no observándose diferencias significativas entre las microemulsiones GOH10 y GOH 20 ($P < 0,05$). Las emulsiones, sin embargo, presentaron valores de DL50 significativamente más altos, superiores a los 56 ppm ($P < 0,05$), véase Tabla 4.3 y Figura 4.6. El valor de la DL50 para GOH no formulado fue de 95.94 ppm (IC: 84,3 a 107,5).

En el caso de las microemulsiones de geranio (Ger 10, 20 y 30), los valores de la DL50 se encontraron próximos a los 56 ppm no observándose diferencias significativas entre ellas ($P < 0,05$), mientras que para las emulsiones de geranio los valores fueron significativamente mayores 77 ppm ($p < 0,05$), véase Tabla 4.3 y Figura 4.7. El valor de la DL50 para el Ger no formulado fue de 89,77 ppm (IC: 80,6-95,8).

Probablemente, la elevada toxicidad de las microemulsiones en comparación con las emulsiones, se asocia al reducido tamaño de las gotículas que constituyen la fase interna lo que proporcionaría un área superficial superior capaz de mejorar la permeación y distribución del principio activo en los tejidos de insectos, aumentando la actividad insecticida (Nel et al, 2006; Nel et al, 2009). Esto, podría deberse a la rápida penetración obtenida por contacto directo a través de la cutícula del insecto, o bien, por ingestión y permeación a través del aparato digestivo (Margulis-Goshen y Magdassi, 2013)

Finalmente, al evaluar el efecto pupicida de las microemulsiones de GEOH 20 y Ger 20, pudo observarse que en este estado del desarrollo las formulaciones fueron más efectivas que en las larvas. Así, GOH 20 produjo valores de DL50 en pupas de 22,9 ppm (IC: 17,60-27,10) y Ger 20: 38,28 ppm (IC: 33,60-41,10).

Dado que las pupas son estados de metamorfosis completa donde el animal deja de alimentarse, el único modo de penetración de los principios activos durante el bioensayo realizado, es la vía cuticular. La alta toxicidad de las microemulsiones en el estado pupal podría estar indicando que el tamaño de las nanogotas es el adecuado para lograr una permeación efectiva a través de la cutícula.

Además, si se tiene en cuenta que durante el estado pupal ocurre una histólisis e histogénesis generalizada, es posible que tanto los mecanismos básicos de decodificación del animal como los órganos blancos de los principios activos sufran modificaciones en los mecanismos de acción haciendo más susceptible a las pupas que a las larvas.

Conforme a los resultados obtenidos en los bioensayos de toxicidad aguda, se pudo determinar que las microemulsiones de GOH fueron más tóxicas que las de Ger, tanto en larvas como en pupas.

Cabe destacar, que GOH es un monoterpeno con una alta actividad insecticida y repelente (*Reis et al, 2016*). Los mecanismos toxicológicos de GOH (probado en cucarachas) implican efectos neurofisiológicos (*Price y Berry, 2006*). Además, este compuesto ha demostrado capacidad para ejercer múltiples efectos dentro de las que se destacan la eficacia como agente insecticida y antimicrobiano (*Asbahani et al, 2015*).

Por otra parte, como se ha mencionado con anterioridad, las microemulsiones presentan gran estabilidad termodinámica. Se forman espontáneamente, una vez alcanzado el equilibrio adecuado entre surfactantes y principios activos, requiriendo solo agitación moderada durante la fabricación.

La estabilidad termodinámica de la fórmula además de reducir los costos de producción, elimina la probabilidad de separación de fases (cremado o sedimentación), comúnmente experimentada con los productos de uso convencional, evitando la presencia de depósitos en tanques y los consecuentes inconvenientes que pudieran surgir tras la pulverización del producto. Asimismo, el componente acuoso presente

como fase continua promovería alta estabilidad tras la dilución en el medio de aplicación.

Referido a esto último y con el objeto de evaluar la capacidad de mantener la actividad larvicida durante cierto período de tiempo, se estudió en larvas de *C. p. pipiens* (a las DL99) la toxicidad residual de las microemulsiones (Ger 20 y GOH 20) y las emulsiones (Ger 70 y GOH 70) así como el efecto de los activos no formulados.

Para las fórmulas de GOH, las dosis estudiadas fueron: GOH 20: 73 ppm; GOH 70: 213 ppm y GOH puro: 156 ppm, véase Figura 4.8. Para las fórmulas de Ger, las dosis estudiadas fueron: Ger 20: 99 ppm; Ger 70: 158 ppm y Ger no formulado: 153 ppm véase Figura 4.9.

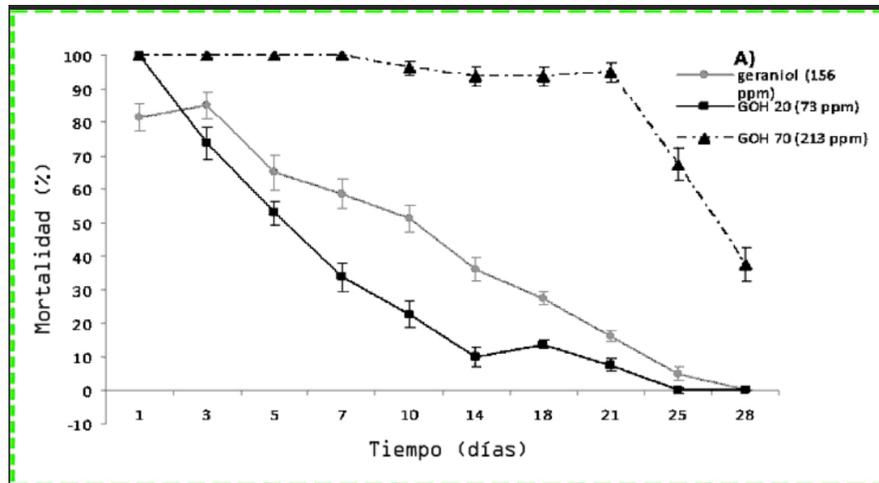


FIGURA 4.8: TOXICIDAD RESIDUAL MICROEMULSIÓN GOH, EMULSIÓN GOH

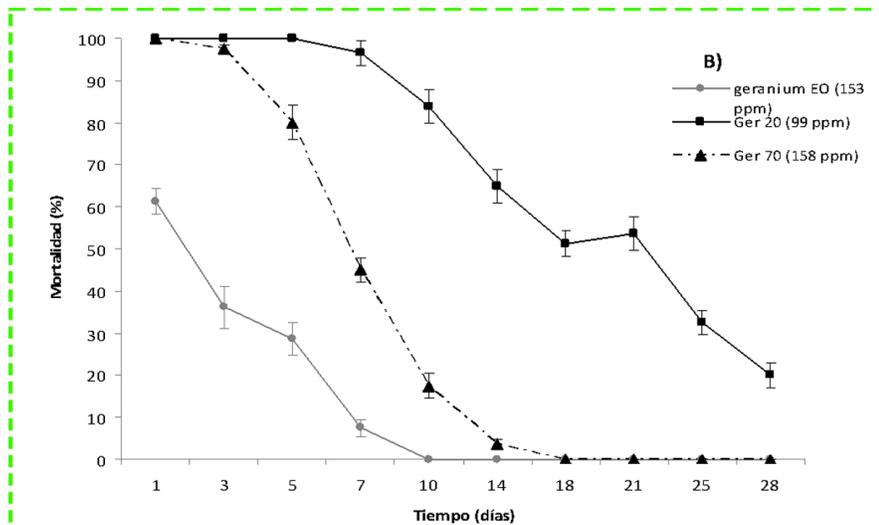


FIGURA 4.9: TOXICIDAD RESIDUAL MICROEMULSIÓN Ger EMULSIÓN Ger.

Para todos los productos se observó una dependencia de la toxicidad en función del tiempo.

La emulsión de GOH fue la más eficaz manteniendo un 100% de mortalidad hasta el séptimo día y generando más del 50% de mortalidad hasta los 25 días de almacenamiento. En contraste, el GOH no formulado produjo una mortalidad del 81,5% después del primer día de almacenamiento y más del 50% hasta el décimo día.

La microemulsión sólo produjo una mortalidad del 100% después del primer día y más de 50% hasta el quinto día de almacenamiento. Es posible concluir que 3 días después de la preparación de las mezclas, la eficacia para formulaciones de GOH fue: emulsión > geraniol no formulado > microemulsión, véase Figura 4.8.

En los bioensayos que contienen aceite esencial de geranio y sus formulaciones, se observó una situación diferente. La fórmula más efectiva fue la microemulsión capaz de producir un 100% de mortalidad hasta el quinto día de almacenamiento y ocasionar más del 50% de mortalidad hasta los 21 días después de la fabricación, véase Figura 4.9.

Por otra parte, la emulsión de geranio sólo produjo una mortalidad del 100% después del primer día de almacenamiento y más del 50% de mortalidad hasta el quinto día. Por último, el aceite esencial de geranio no formulado generó una mortalidad 61,55% después del primer día de almacenamiento.

Para la emulsión de geranio y el aceite esencial de geranio no formulado, luego de 18 días de almacenamiento no se observó actividad larvicida, mientras la microemulsión produjo efecto hasta el final del bioensayo. En conclusión, la eficacia larvicida de Ger fue: microemulsión > emulsión > Ger no formulado, véase Figura 4.9.

Teniendo en cuenta los resultados se puede concluir la existencia de diferencias en los perfiles toxicológicos residuales: para el GOH, la emulsión fue la más efectiva y para Ger, la microemulsión fue el sistema que demostró mayor actividad residual. Esto podría explicarse teniendo en cuenta la composición de la fase dispersa. El aceite de geranio contiene más de 10 monoterpenos, mientras que sólo uno de estos componentes constituye la fase dispersa de las formulaciones de GOH.

En el primer caso, probablemente, la diversidad de las fuerzas internas generadas entre los monoterpenos y las cadenas hidrocarbonadas de tensioactivos sea capaz de minimizar la disrupción en la región interfacial tras la dilución las microemulsiones. En

consecuencia, este tipo de microemulsión podría resistir el efecto de dilución en mayor medida respecto de aquellas formadas solo por un único componente GOH.

De este modo, para el caso del GOH, es probable que la dilución afecte la estabilidad del sistema a lo largo del tiempo generando una reducción de los efectos toxicológicos durante el transcurso del bioensayo. En consecuencia, el efecto larvicida general puede atribuirse a la cantidad total de principio activo a la que fueron expuestos los insectos: GOH 70 (213 ppm) > GOH no formulado (156 ppm) > GOH 20 (73 ppm).

Para concluir, incluso en los bioensayos toxicológicos agudos, las microemulsiones de GOH fueron más tóxicas que las del Ger. Se prefieren, sin embargo, las últimas como formulaciones larvicidas debido a la estabilidad tras la aplicación.

De acuerdo con nuestros resultados y teniendo en cuenta que el tiempo de desarrollo del huevo de *C. pipiens pipiens* a adultos es de 10 a 14 días, dependiendo de la temperatura, humedad y fotoperiodo (*Becker et al, 2010*), una vez que la microemulsión de Ger se aplica en campo, la toxicidad residual probablemente podría afectar al primer estadio de la nueva generación manteniendo el control hasta una nueva aplicación.

CONCLUSIÓN

La estrategia más adecuada de control de insectos plaga, procura minimizar los posibles efectos nocivos sobre el medio ambiente evaluando los costes relativos de control en función de la eficacia alcanzada, en términos de mejora de la calidad de vida, prevención de enfermedades así como la reducción en los volúmenes de plaguicidas y frecuencia de los tratamientos a realizar.

Debido a la falta de vacunas y medicamentos adecuados para el tratamiento de algunas enfermedades causadas por mosquitos, una buena alternativa es controlar a la población del vector durante la fase inicial, en la cual las larvas se encuentran inmóviles. Cabe destacar, que la resistencia a los pesticidas así como los efectos deletéreos, asociados a la acumulación en el ambiente, generan la necesidad de emplear formulas naturales.

En la búsqueda de alternativas reales que puedan aplicarse en los programas de control de enfermedades transmitidas por vectores, los aceites esenciales constituyen una excelente opción por su potencial actividad larvicida, bajo nivel de toxicidad para los mamíferos y su limitado impacto ambiental consecuencia de la biodegradabilidad (*Sugumar et al, 2014*).

Las microemulsiones o/w diseñadas, facilitaron la formulación de dichos aceites permitiendo la obtención un producto final hidrosoluble capaz de ser aplicado efectivamente en los medios acuáticos habitados por las larvas de *Culex pipiens pipiens*. Asimismo, el empleo de sistemas tensioactivos de baja toxicidad, la estabilidad termodinámica y el tamaño extremadamente pequeño de las gotas hacen que estos sistemas resulten atractivos debido a los altos niveles de eficacia biológica, bajo impacto ambiental y sobre el operador, así como el reducido costo de manufactura.

La facilidad de difusión/propagación de la formula en medio acuoso desde su sitio de aplicación facilitaría el uso a pequeña escala. De este modo, el control de mosquitos en espacios acuáticos reducidos, podría ser realizado por miembros de comunidades rurales sin maquinaria o capacitación especializada ya que todos los componentes de la mezcla son materiales orgánicos seleccionados por su baja toxicidad en mamíferos, al

igual que los aceites esenciales y sus componentes (comúnmente empleados en productos de uso cosmético).

Conforme a los resultados obtenidos en los ensayos biológicos, se puede concluir que la microemulsión del aceite de geranio constituye una nueva opción para el manejo integrado de la población de *Culex pipiens pipiens*.

No obstante, las condiciones de los experimentos descritos aquí difieren de aquellos en el campo, en cuanto a variaciones de algunas condiciones experimentales (tal es el caso de la presencia de la tapa del recipiente de ensayo, que si bien presenta pequeñas perforaciones podría reducir la pérdida por evaporación de los compuestos volátiles, variaciones de temperatura y demás perturbaciones que podrían destruir la película superficial). Consecuentemente, la fórmula requeriría pruebas de campo debiendo verificarse la factibilidad de aplicación a través de estudios más exhaustivos.

BIBLIOGRAFÍA

Ahn, Y.J., Kim, S.I., Kim, H.K., Tak, J. H. Naturally occurring house dust mites control agents: development and commercialization. En: Rai, M y Carpinella, M (eds). *Advances in Phytomedicine. Naturally Occurring Bioactive Compounds*, pp: 269-289. Elsevier B.V, Países Bajos.

Almiron, W. R y Rossi, G. (2005). Culicidae Mosquitos. En Salomon, O. D (ed). *Artrópodos de interés médico en Argentina*, pp.75-83. Coordinación Editorial Buenos Aires, Fundación Mundo Sano, Argentina.

Asbahani, A. E., Miladi, K., Badri, W., Sala, M., Addi, E. H. A., Casabianca, H., ... Elaissari, A. (2015). Essential oils: From extraction to encapsulation. *International Journal of Pharmaceutics*, 483(1-2), pp: 220-243.

Balson, T y Felix, B. (1995). Biodegradability of Non Ionic Surfactants. En: Karsa, D.R y Porter, M. R (eds). *Biodegradability of Surfactants*, pp: 204-230. Springer-Science +Business Media, B.V, Países Bajos.

Batish, D. R., Singh, H. P., Setia, N., Kohli, R. K., Kaur, S y Yadav, S. S. (2007). Alternative control of littleseed canary grass using eucalypt oil. *Agronomy for Sustainable Development*, 27(3), pp: 171-177.

Becker, N., Zgomba, M., Petric, D., Dahl, C., Boase, C., Lane, J y Kaiser, A (eds). (2010) Biology of Mosquitoes. En: *Mosquitoes and Their Control*, pp: 9-42. Springer-Verlag, Alemania.

Bergillos Gasion, F y Rivas-Fernandez, M. A (eds). (2006). Dípteros. En: *Toxinología Clínica. Lesiones por picaduras y mordeduras de animales*, pp: 231-253. Bubok Publishing, España.

Betancourt, C y Scantoni, I. M. E (ed). (2009). *Orden Díptera, Insectos del Uruguay*. Universidad de la República, Facultad de Agronomía-Facultad de Ciencias, Uruguay.

Botas, G., Cruz, R., de Almeida, F., Duarte, J., Araújo, R., Souto, R.,... Fernandes, C. (2017). Baccharis reticularia D C. and Limonene Nanoemulsions: Promising Larvicidal Agents for Aedes aegypti (*Diptera: Culicidae*) Control. *Molecules*, 22(11), pp: 1990-2003.

Brogdon, W y Mc Allister, J. C. (1998). Insecticide Resistance and Vector Control. *Emerging Infectious Diseases*, 4(4), pp: 605-613.

Bueno Marí, R. (2010). Bioecología, diversidad e interés epidemiológico de los culcídicos mediterráneos (Diptera: Culicidae) [Tesis Doctoral]. Editorial Servei de Publicacions de la Universitat de València Estudi General.

Céspedes, C. L., Avila, A. J., Marin, J. C., Dominguez, M. L., Torres, P y Aranda, E. (2006). Natural Compounds as antioxidant and molting inhibitors can play a role as a model for search of new botanical pesticides. En: Rai, M y Carpinella, M (eds). *Advances in Phytomedicine. Naturally Occurring Bioactive Compounds*, pp: 1-27. Elsevier B.V, Países Bajos.

Chamberlain, R. W. y Sudia, W. D. (1961). Mechanism of Transmission of Viruses by Mosquitoes. *Annual Review of Entomology*, 6(1), pp: 371-390.

Chang, K. S., Kim, H. C., Klein, T. A y Ju, Y. R. (2016). Insecticide resistance and cytochrome-P450 activation in unfed and blood-fed laboratory and field populations of *Culex pipiens pallens*. *Journal of Pest Science*, 90(2), pp: 759-771.

Chayiana, W., Saeio, K., Hennink, W. E y Okonogi, S. (2010). Characterization of potent anticholinesterase plant oil based microemulsion. *International Journal of Pharmaceutics*, 401(1-2), pp: 32-40.

Chellappandian, M., Vasantha-Srinivasan, P., Senthil-Nathan, S., Karthi, S., Thanigaivel, A., Ponsankar, A., Kalaivani, K y Hunter, W. B. (2018). Botanical essential oils and uses as mosquitocides and repellents against dengue. *Environmental Internationally*, 113, pp: 214-230.

Clemments, A. N (ed). (1963). Reproduction. En: *The physiology of mosquitoes*, pp: 164-190. Pergamon Press, U.K

Clemments, A. N (1992). *Biology of Mosquitoes: Development, nutrition and reproduction*.

Coats, J. R. (1994). Risks From Natural Versus Synthetic Insecticides. *Annual Review of Entomology*, 39 (1), pp: 489-515.

Cuervo-Parra, J. A., Cortés, T. R. y Ramirez-Lepe, M. (2016). Mosquito-Borne Diseases, Pesticides Used for Mosquito Control, and Development of Resistance to Insecticides. En: Trdan, S (ed). *Insecticides Resistance*, pp: 111-134. In Tech ExLi4EvA.

Cui, F., Lin, L. F., Qiao, C. L., Xu, Y., Marquine, M., Weill, M y Raymond, M. (2006). Insecticide resistance in Chinese populations of *Culex pipiens complex* through esterase overproduction. Insecticide resistance in *Culex pipiens*. *Entomología Experimentalis et Applicata*, 120, pp: 211-220.

Dahl, C., Widahl, L y Nilsson, C. (1988). Functional analysis of the suspension feeding system in mosquitoes (Diptera: *Culicidae*). *Annals of Entomological Society of America*, 81(1), pp: 105-127.

Dang, K., Doggett, S. L., Veera Singham, G y Lee, C. Y. (2017). Insecticide resistance and resistance mechanisms in bed bugs, *Cimex spp.* (Hemiptera: *Cimicidae*). *Parasites & Vectors*, 10(1), pp: 1-31.

- Durden, L. A., Mullen, G. R.(ed) (2019). Chapter 1: Introduction. En: Durden, L. A y Mullen, M (eds). *Medical and Veterinary Entomology*, pp: 01-16. Academic Press, Elsevier, U.K.
- Dyar, H. G. (1902). The eggs of mosquitoes of the genus *Culex*. *Science*, 16(408), pp: 672-673.
- Edris, A. E y Malone, C. F. R. (2012). Preferential solubilization behaviours and stability of some phenolic-bearing essential oils formulated in different microemulsion systems. *International Journal of Cosmetic Science*, 34(5), pp: 441-450.
- Enan, E. E. (2005). Molecular and pharmacological analysis of an octopamine receptor from American cockroach and fruit fly in response to plant essential oils. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 59(3), pp: 161-171.
- Faleiro, M. L y Miguel, M. G. (2013). Use of Essential Oils and Their Components against Multidrug-Resistant Bacteria. En: Rai, M. K y Kon K. V (eds). *Fighting Multidrug Resistance with Herbal Extracts, Essential Oils and Their Components*, pp: 65-94. Academic Press, Elsevier, U.K.
- Feyereisen, R. (1999). Insect P450 enzymes. *Annual Review of Entomology*, 44, pp: 507-33.
- Foster, W. A y Walker, E. D. (2019). Mosquitoes (*Culicidae*). En: Muller, G. R y Durden, L. A (eds). *Medical and Veterinary Entomology*, pp: 261-317. Academic Press, Elsevier, U.K.
- Goddard, J (ed). (2008). Dynamic of Arthropods. En: *Infectious diseases and arthropods*, pp: 19-28. Human Press, Springer Science + Business Media, USA.
- Heymann, D. L (ed). (2005). Filariasis. En: *El Control de Enfermedades Transmisibles*, pp: 301-306. Organización Panamericana de la Salud – Organización Mundial de la Salud, USA.
- Isman, M. B. (1997). Neem and other botanical insecticides: Barriers to commercialization. *Phytoparasitica*, 25(4), pp: 339-344.
- Isman, M. B. (2000). Plant essential oils for pest and disease management. *Crop Protection*, 19(8-10), pp: 603-608.
- Isman, M. B. (2006). Botanical Insecticides, Deterrents, and Repellents in Modern Agriculture and an Increasingly Regulated World. *Annual Review of Entomology*, 51(1), pp. 45-66.
- Isman, M. B y Machial, C. M. (2006). Pesticide based on Plant Essential Oils: From Traditional Practice to Commercialization. En: Rai, M y Carpinella, M (eds). *Advances in*

Phytomedicine. Naturally Occurring Bioactive Compounds, pp: 29-44. Elsevier B.V, Países Bajos.

Jankowska, M., Rogalska, J., Wyszowska, J y Stankiewicz, M. (2018). Molecular Targets for Components of Essential Oils in the Insect Nervous System—A Review. *Molecules*, 23(34), pp: 1-20.

Jesser, E. N., Yeguerman, C. A., Stefanazzi, N., Gomez, R., Murray, A. P., Ferrero, A. A y Werdin González, J. O. (2020). An ecofriendly approach for the control of a common insect pest in the food industry, combining polymeric nanoparticles and post-application temperatures. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 68 (21), pp: 5951-5958.

Joshi, P. L. Epidemiology of Lymphatic Filariasis. En: Tyagi, B. K (ed). *Lymphatic Filariasis. Epidemiology, Treatment and Prevention – The Indian Perspective*, pp: 1-14. Springer, Nature, Signapore.

Kah, M., Beulke, S., Tiede, K y Hofmann, T. (2013). Nanopesticides: State of Knowledge, Environmental Fate, and Exposure Modeling. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 43, pp: 1823-1867.

Katiyar, D y Singh, K. L. (2011). Filariasis: Current Status, Treatment and Recent Advances in Drug Development. *Current Medicinal Chemistry*, 18 (14), pp: 2174–2185.

Killeen, G. F., Fillinger, U y Knols, B. G. (2002). Advantages of larval control for African malaria vectors: Low mobility and behavioural responsiveness of immature mosquito stages allow high effective coverage. *Malaria Journal*, 1(1), pp: 1-7.

Koenemann, S., Jenner, R. A., Hoenemann, M., Stemmea, B. M y Reumont. V (2010). Arthropod phylogeny revisited, with a focus on crustacean relationships. *Arthropod Structure & Development*, 39 (2-3), pp: 88-110.

Komgata, O., Kasai, S y Tomita, T. (2010). Overexpression of cytochrome P450 in pyrethroid resistant *Culex quinquefasciatus*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 40(2), pp: 146-152.

Kostyukovsky, M., Rafaeli, A., Gileadi, C., Demchenko, N y Shaaya, E. (2002). Activation of octopaminergic receptors by essential oil constituents isolated from aromatic plants: Possible mode of action against insect pests. *Pest Management Science*, 58(11), pp: 1101-1106.

Kumar, P., Mishra, S., Malik, A y Satya, S. (2011). Insecticidal properties of Mentha species: A review. *Industrial Crops and Products*, 34(1), pp: 802-817.

Lehane, M. The blood sucking insects group. En: *The biology of blood sucking insects*, pp: 202-258, Cambridge University Press, UK.

Liu, N. (2015). Insecticide Resistance in Mosquitoes: Impact, Mechanisms, and Research Directions. *Annual Review of Entomology*, 60(1), pp: 537-559.

López Sánchez (1989). Control integral de mosquitos en Huelva, Junta de Andalucía, Consejería de Salud y Servicios Sociales. Sevilla.

Lorenz, L. M., Maia, M. F y Moore, S. J. (2013). The use of plants in vector control. En: Cameron, M. M y Lorenz, L. M (eds). *Biological and Environmental Control of Disease Vectors*, pp: 42-67. CAB International, UK.

Manguin, S., Mouchet, J y Carnavale, P. (2011). Main topics in Entomology. En: López, O y Fernández Bolaños, J. G (eds). *Green Trends in Insect Control*, pp: 01-52. RSC Publishing, UK.

Margulis-Goshen, K y Magdassi, S. (2013). Nanotechnology: An advanced approach to the development of potent insecticides. En: Ishaaya, I., Palli, S. R., Horowitz, S. R., Rami, A (eds). *Advanced Technologies for Managing Insect Pests*, pp: 295-314. Springer-Science +Business, Países Bajos.

Merritt, R. W., Dadd, R. H y Walker, E. D. (1992). Feeding Behavior, Natural Food, and Nutritional Relationships of Larval Mosquitoes. *Annual Review of Entomology*, 37(1), pp: 349-374.

Merritt, R. W., Mortland, M. M., Gersabeck, E. F y Douglas, H. R. (1978). X-Ray Diffraction Analysis of Particles Ingested By Filter-Feeding Animals. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 24(1), pp: 27-34.

Merritt, R. W y Wallace, J. B. Aquatic Habitats. (2003). En: Resh, V. H y Cardé, R. T (eds). *Encyclopedia of Insects*, pp: 45-57, Academic Press, USA.

Misra, G y Pavlostathis, S. G. (1997). Biodegradation kinetics of monoterpenes in liquid and soil-slurry systems. *Applied Microbiology and Biotechnology*, (47), pp: 572-577.

Moretti, M. D, Sanna-Passino, G., Demontis, S y Bazzoni, E. (2002). Essential oil formulations useful as a new tool for insect pest control. American Association of Pharmaceutica Science. *Pharmaceutical Science and Technology*, 13(2), pp: 64-74.

Nel, A., Xia, T., Madler, L y Li, N. (2006). Toxic Potential of Materials at the Nanolevel. *Science*, 311(5761), pp: 622-627.

Nel, A. E., Mädler, L., Velegol, D., Xia, T., Hoek, E. M. V., Somasundaran, P., Klaessig, F., Castranova, V y Thompson, M. (2009). Understanding biophysicochemical interactions at the nano-bio interface. *Nature Materials*, 8(7), pp: 543-557.

Patel, M. R., Patel, R. B., Parikh, J. R., Solanki, A. B y Patel, B. G. (2009). Effect of Formulation Components on the In Vitro Permeation of Microemulsion Drug Delivery

System of Fluconazole. *American Association of Pharmaceutical Science Pharmaceutical Science and Technology*, 10(3), pp: 917-923.

Pérez-Arellano, M., Bolaños-Rivero, M., Fernández-Soto, P y Muro, A. (2010). Artrópodos y enfermedades. *Medicine*, 10(55), pp: 3747-3756.

Poupardin, R., Reynaud, S., Strode, C., Ranson, H., Vontas, J y David, J. P. (2008). Crossinduction of detoxification genes by environmental xenobiotics and insecticides in the mosquito *Aedes aegypti*: Impact on larval tolerance to chemical insecticides. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 38(5), pp: 540-51.

Prajapati, V., Tripathi, A. K., Aggarwal, K. K y Khanuja, S. P. S (2005). Insecticidal, repellent and oviposition-deterrent activity of selected essential oils against *Anopheles stephensi*, *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus*. *Bioresource Technology*, 96(16), pp: 1749-1757.

Price, D. N y Berry, M. S. (2006). Comparison of effects of octopamine and insecticidal essential oils on activity in the nerve cord, foregut, and dorsal unpaired median neurons of cockroaches. *Journal of Insect Physiology*, 52(3), pp: 309-319.

Reis, S., Mantello, A., Macedo, J., Gelfuso, E., da Silva, C., Fachin, A., ... Belebony, R. (2016). Typical Monoterpenes as Insecticides and Repellents against Stored Grain Pests. *Molecules*, 21(3), pp: 258-267.

Sasson, Y., Ruso, G., Toledano, O e Ishaaya, I. (2007). Nanosuspensions: Emerging Novel agrochemical. En: Ishaaya, I., Nauen, R y Horowitz, R. A. (eds). *Insecticides design using advanced technologies*, pp: 1-39. Springer-Verlag, Alemania.

Sottmann, T y Stubenrauch, C. (2009). Phase Behaviour, Interfacial Tension and Microstructure of Microemulsions. En: Stobernauch, C (ed). *Microemulsions: Background, New Concepts, Applications, Perspectives*, pp: 1-47. WILEY, UK.

Sugumar, S., Clarke, S. K., Nirmala, M. J., Tyagi, B. K., Mukherjee, A y Chandrasekaran, N. (2014). Nanoemulsion of eucalyptus oil and its larvicidal activity against *Culex quinquefasciatus*. *Bulletin of Entomological Research*, 104(3), pp: 393-402.

Tadros, T. F (ed) (2009). Microemulsions. En: *Colloids in Agrochemicals*, pp: 197-218. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Alemania.

Wang, J. F. (2000). Esterase phenotypes in natural populations of *Culex pipiens pallens* (Diptera: *Culicidae*) and their variations under insecticide selection. *Entomología SINICA*, 7(3), pp: 265-270.

WHO (1982). Mosquitos. mosquito-borne disease and mosquito control methods: a review. En: *Manual on Environmental Management for Mosquito Control With Special Emphasis on Malaria Vectors*, pp: 11-27. World Health Organization, Suiza.

WHO (1996). Phase I: Laboratory Studies. En: *Evaluation and Testing of Insecticides*, pp: 37-40. WHO/HQ, Suiza.

PUBLICACIONES RELACIONADAS A ESTE TRABAJO DE TESIS

Publicaciones

Montefuscoli, A. R., Werdin González, J. O., Palma, S. D., Ferrero, A. A y Fernández Band, B. (2013). Design and development of aqueous nanoformulations for mosquito control. *Parasitology Research*, 113(2), pp: 793–800.

Participación en Congresos

Nombre del Congreso: IV Congreso Argentino de Materia Blanda. Título del trabajo: Diseño de una microemulsión con potencial actividad repelente de insectos. Autores: Montefuscoli, A. R., Schulz P.C., Palma S. D., Fernández Band B. S. Lugar: Bahía Blanca. Fecha: 21 al 23 de Noviembre, 2012. Tipo de participación: **Autor**.

Nombre del Congreso: 2° Reunión Internacional de Ciencias Farmacéuticas. Título del trabajo: Microemulsions as Drug Delivery Systems. Autores: Montefuscoli, A. R., Schulz P. C., Fernández Band, B., Palma, S. D. Lugar: Rosario. Fecha: 22, 23 de Noviembre, 2012. Tipo de participación: **Expositor**.

Nombre del congreso: XI Simposio Argentino y XIV Simposio Latinoamericano de Farmacobotánica I Congreso Latinoamericano de Plantas Medicinales. Autores: Montefuscoli, A. R., Werdin González, J. O., Palma, S. D., Ferrero, A. A y Fernández Band, B. S. Lugar: Rosario, Santa Fé. Fecha: Noviembre de 2013. Tipo de Participación: **Autor**.

Congresos Publicados

Montefuscoli, A. R., Werdin González, J. O., Palma, S. D., Fernández Band, B. S y Ferrero, A. A. (2013). Nanoformulaciones acuosas de productos naturales con actividad larvicida. *Dominguezia*. 29 (suplemento): 85-86. Museo de Farmacobotánica "Juan A. Domínguez", UBA. ISSN 1669-6859. Datos del evento: XI Simposio Argentino y XIV Simposio Latinoamericano de Farmacobotánica y I Congreso Latinoamericano de Plantas Medicinales. Rosario, Santa Fe. Noviembre de 2013.

Artículos de divulgación

Microemulsiones como sistema portador de fármacos. *Revista Nuestra Farmacia* (2011). N° 62. Autores: Montefuscoli, A. R., Llabor, J. M., Allemandi, D., Fernandez Band, B. S y Palma, S. D.