UNS UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR

2025

Bahía Blanca, Argentina

Tesis de Doctorado en Química

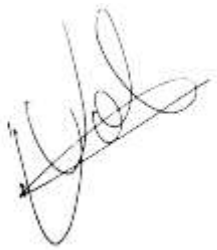
Diseño y estudios analíticos de microemulsiones portadoras de fármacos y biocidas

Farm. Verónica Volpe

Director: Dr. Marcos Grünhut

PREFACIO

Esta Tesis se presenta como parte de los requisitos para optar al grado Académico de Doctora 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 ámbito del Departamento de Química durante el período comprendido entre el 06 de septiembre de 2016 y el 06 de junio de 2025 bajo la dirección del Dr. Marcos Grünhut.



Farmacéutica Verónica Volpe

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR
Subsecretaría de Posgrado

La presente tesis ha sido aprobada el …….

mereciendo la calificación de …….

Certifico que fueron incluidos los cambios y correcciones sugeridas por los jurados.

Para Titi

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi más profundo agradecimiento a todas las personas que de una u otra forma, han contribuido a la realización de esta Tesis.

En primer lugar, a mi director, el Dr. Marcos Grünhut, por guiarme, acompañarme y compartir generosamente sus conocimientos. Su apoyo ha sido invaluable y le estoy profundamente agradecida.

A las Dras. Beatriz Fernández Band y Adriana Ferrero, por su orientación y apoyo durante los inicios de esta investigación.

Quisiera agradecer a todos los profesores, docentes e integrantes del Área III, quienes formaron parte de alguna u otra manera en el proceso de esta Tesis.

En particular, a las cátedras en las que tuve el privilegio de formar parte: Análisis Instrumental, Técnicas Analíticas Instrumentales y Química Analítica Aplicada. Agradezco especialmente a los Profesores Dres. María E. Centurión, Valeria Springer, Carolina Acebal y Marcelo Pistonesi, por brindarme un entorno académico estimulante, transmitirme su vocación y confiar en mí.

A quienes fueron mis compañeros y compañeras de docencia: Ale, Gabi, Mari, Nati G., Mai, Mariano, Yas y Yani; y a quienes lo son actualmente: Fede, Sil y Manu. Gracias por los momentos compartidos y por su apoyo.

A las Dras. Norma Tombesi y Mónica Álvarez, por despertar en mí la vocación por la investigación desde mis primeros pasos como estudiante y por haberme guiado también en mis inicios en la docencia.

A los Prof. Dres. Claudia Domini, Mariano Garrido, Marcelo Pereyra, y Andrés Arias, por contribuir a mi formación y acompañarme en este camino.

A todos los integrantes del laboratorio FIA: Pacho, Ana, Nati LL., Dami, Nico, Flor, Nati G., Mai, Checho y Mari, por los momentos compartidos al inicio de mis investigaciones y que, de una forma u otra, formaron parte de este proceso.

A mis compañeras de oficina, quienes lo fueron: Dani, Nati, y Mari; y quienes lo son hoy: Cin y Ana. Gracias por su apoyo, compañerismo y amistad.

A Mati, por estar presente desde los inicios de esta investigación, por confiar en mí y por su amistad.

A la Dra. Fernanda Buzzola, por abrirme las puertas de su grupo de investigación y brindarme su ayuda y experiencia. Le agradezco profundamente por su colaboración y dedicación.

A las Dras. Guillermina Dolcini y Sandra Pérez, cuyo compromiso y colaboración han sido fundamentales a lo largo de este trabajo. Gracias por su dedicación y acompañamiento.

A mis padres y a mi hermano Ariel, por su amor, confianza y por estar siempre presentes. Este logro también es de ustedes.

A Darío, por ser mi sostén incondicional, por su amor, su paciencia y por no dejarme bajar los brazos.

A mis amigas y amigos de la vida: Gise, Mari B., Kari, Gabi, Andre, Flor, Pame, Eze, Maxi y Mari C., por ser uno de mis pilares y brindarme siempre su apoyo.

Gracias a todos por hacer posible este logro.

Resumen

El desarrollo de nuevos productos farmacéuticos y de cuidado personal que proporcionen múltiples acciones terapéuticas, más selectivas, duraderas o con menos efectos adversos para el organismo, es un desafío permanente en el campo de la investigación farmacéutica y cosmética. Sin embargo, existen problemas relacionados con la biodisponibilidad y estabilidad de distintas moléculas activas atribuibles principalmente al sistema portador o forma farmacéutica en la cual es vehiculizada, lo que promueve el diseño de nuevos sistemas portadores capaces de mejorar la efectividad terapéutica. En particular, es importante potenciar el desarrollo de formulaciones innovadoras, de bajo costo y mediante procedimientos sostenibles, que puedan llegar a distintos sectores de la sociedad y contribuyan a resolver problemáticas de salud pública como los efectos de la exposición solar excesiva y las infecciones ocasionadas por ciertos patógenos oportunistas, así como problemáticas que comprometen la producción y salud animal como ciertas enfermedades virales que afectan al ganado bovino. Por otro lado, el desarrollo de nuevas formulaciones involucra la implementación de procedimientos analíticos para la evaluación de su eficacia y estabilidad. En este contexto, es necesario el desarrollo de nuevas metodologías analíticas sostenibles que reemplacen parcial o totalmente los métodos actuales de análisis, los cuales suelen involucrar el uso de técnicas costosas y poco amigables con el ambiente.

Las microemulsiones son sistemas dispersos y organizados constituidos por una fase oleosa, una fase acuosa y una mezcla de surfactante:co-surfactante, las cuales son transparentes, ópticamente isotrópicas y termodinámicamente estables. La existencia de microdominios de diferente polaridad posibilita solubilizar compuestos tanto hidrofílicos como lipofílicos, incluso si resulta de interés en simultáneo en la misma formulación. Las microemulsiones se han utilizado para cargar fármacos y biocidas con el objetivo de mejorar su biodisponibilidad y estabilidad. Estos sistemas presentan la capacidad de proteger compuestos lábiles y permitir la liberación del activo cargado de forma sostenida y controlada. Además, la obtención de estos sistemas es simple, rápida y requiere de procedimientos de baja energía lo que contribuye a la sustentabilidad.

Por otro lado, la vía de administración de un fármaco supone un factor determinante en las propiedades farmacocinéticas del mismo, condicionando en última instancia su eficacia y efecto biológico. El desarrollo de nuevos sistemas portadores tiene como objetivo mejorar las propiedades farmacocinéticas del fármaco de manera que

disminuya al máximo los efectos adversos dependientes de la vía de administración y su distribución posterior en el organismo. En particular, la vía de administración tópica permite aplicar el fármaco en el lugar de acción de tal manera que el efecto es local, evitando la absorción sistémica del mismo. Esta vía se utiliza para el tratamiento local de afecciones de la piel evitando el primer paso hepático y las fluctuaciones de las concentraciones plasmáticas. Además, permite una absorción adecuada del fármaco, reduce la variabilidad interindividual en la absorción, prolonga la duración de la acción y mejora el cumplimiento terapéutico. Además, es la vía utilizada para la aplicación de diferentes productos de cuidado personal tales como protectores solares.

En la primera parte del presente trabajo de Tesis, se diseñó una nueva formulación del tipo microemulsión aceite en agua (o/w) como portador del filtro químico solar benzofenona-3 (BZ3), a partir de materiales biocompatibles y de uso común en la producción de productos de uso cosmético como miristato de isopropilo (fase oleosa), Tween 80: etanol (surfactante:co-surfactante) y agua (fase acuosa). Mediante la construcción de diagramas de fases pseudoternarios se obtuvieron distintas microemulsiones las cuales se caracterizaron fisicoquímicamente. En base a estos resultados se seleccionó un sistema óptimo para la carga de BZ3 al 2,0% (p/p). La formulación obtenida (BZ3-ME) estuvo compuesta por 2,5% (p/p) de miristato de isopropilo, 42,0% (p/p) de una mezcla Tween 80: etanol (2:1) y 55,5% (p/p) de agua. La misma presentó una distribución de tamaño uniforme (PdI = 0,224 ± 0,017) y un tamaño de gota en el rango nanométrico (Z = 11,90 ± 0,93 nm). El pH obtenido (5,50 ± 0,03) resultó apropiado para la aplicación tópica y los resultados de índice de refracción (1,3350 ± 0,0002) y conductividad eléctrica (0,065 ± 0,010) mS corroboraron que se trató de un sistema isotrópico y de tipo aceite en agua (o/w), respectivamente. Entonces, se realizaron estudios analíticos de degradación térmica de BZ3 a 60ºC para evaluar el comportamiento del filtro cuando se encontraba cargado en la microemulsión (BZ3-ME) respecto a cuando se encontraba en un medio no-organizado (BZ3-NO). La detección se realizó mediante espectrometría de fluorescencia molecular lo que permitió monitorear en tiempo real dicho proceso y obtener los correspondientes perfiles de degradación térmica. El perfil de BZ3-NO presentó una disminución en la concentración de BZ3 a lo largo del tiempo de análisis, arrojando una constante cinética de termodegradación *Kt* de (0,069 ± 0,001) min^{-1} mientras que el perfil de BZ3-ME se mantuvo sin cambios bajo las condiciones de estudio. Esto indicó que el sistema portador protegió de cierta manera al filtro químico solar de la degradación inducida por la temperatura, en las condiciones estudiadas. Por

otra parte, se abordó un estudio de permeación *in-vitro* de BZ3-ME utilizando la tradicional celda de difusión de Franz, y mediante detección por espectrometría de absorción molecular UV-Vis. El proceso de permeación de BZ3 se registró durante 60 min utilizando una membrana sintética de acetato de celulosa. La concentración acumulada de BZ3 por unidad de área se relacionó linealmente con el tiempo de permeación, y a partir del perfil de permeación de BZ3 se calculó la correspondiente constante de permeación *Kp* la cual fue de ($3{,}06 \times 10^{-3} \pm 4{,}0 \times 10^{-7}$) cm h^{-1} sugiriendo que BZ3 presentó un perfil de permeación adecuado en el sistema portador propuesto y comparable con el filtro cargado en otros sistemas portadores reportados en la literatura. Finalmente, se determinó la eficacia de BZ3-ME mediante la determinación del factor de protección solar *in-vitro* ($FPS_{in\text{-}vitro}$) el cual fue 2,0, un valor esperable dada la concentración de filtro químico utilizado y a que fue el único filtro cargado en la microemulsión.

En un segundo trabajo, se utilizó la microemulsión previamente obtenida como sistema portador de ciprofloxacina (CIP), el cual es un antibiótico de amplio espectro utilizado para el tratamiento de infecciones causadas por el patógeno oportunista *Staphylococcus aureus*. En este caso, se logró cargar de manera exitosa la microemulsión con una concentración final de CIP de 0,3% (p/p) la cual estuvo dentro del rango terapéutico. La formulación (CIP-ME) se caracterizó fisicoquímicamente y los resultados mostraron que se trató de un sistema monodisperso (PdI = 0,259 ± 0,021) y con un tamaño de gota nanométrico (Z = 13,44 ± 0,24 nm), lo que en este caso fue corroborado a través de microscopía electrónica de transmisión (TEM). Además, la formulación presentó un valor de pH de 5,32 ± 0,01 el cual resultó óptimo para uso tópico e intranasal y una osmolaridad de 341,9 mOsm L^{-1} la cual resultó adecuada para la instilación. Por otro lado, se estudió mediante espectrometría de fluorescencia molecular la distribución de CIP en la microemulsión (o/w), dada la moderada solubilidad del antibiótico en agua, concluyendo que éste se ubicó preferentemente en la interfase fase oleosa-fase acuosa, e interaccionando probablemente con el surfactante. A su vez, se abordó un estudio de permeación *in-vitro* para el cual se diseñó un sistema automático en línea, de fácil implementación, bajo costo y utilizando electrónica Arduino, el cual empleó la tradicional celda de difusión de Franz y permitió monitorear en tiempo real mediante espectroscopía de fluorescencia molecular el proceso de permeación de CIP a través de una membrana sintética que simuló la piel. A partir del análisis espectral se obtuvieron los perfiles de permeación de CIP en la microemulsión (CIP-ME) y en un medio no-organizado (CIP-

NO) que permitieron calcular las correspondientes constantes de permeación (*Kp*). Los resultados obtenidos de la cinética de permeación de CIP en CIP-ME (Kp = 2,76 × 10^{-4} ± 9,00 × 10^{-6}) respecto a CIP-NO (5,30 × 10^{-5} ± 5,0 × 10^{-7}) mostraron que la difusión a través de la membrana de CIP en CIP-NO fue significativamente menor en contraste con CIP-ME. Por último, se realizaron estudios biológicos *in-vitro* e *in-vivo* de la actividad antimicrobiana utilizando un modelo murino de infección cutánea y otro de infección intranasal para comprobar la efectividad de la formulación propuesta, y de esta manera obtener la eficacia terapéutica en el sitio de la infección. Entonces, se evaluaron los efectos de CIP-ME sobre la piel de ratones infectados por *S. aureus*. Luego de 24 h de la infección se observó una reducción visible de las lesiones y del eritema en el área afectada cuando los ratones fueron tratados con CIP-ME respecto a los ratones del grupo control, que presentaron lesiones ulceradas y eritematosas con escaso exudado. Además, el número de bacterias viables recuperadas de la piel de los ratones tratados con CIP-ME fue significativamente menor que el de los grupos control, lo que demostró que el tratamiento con CIP-ME provocó una reducción significativa de la infección en piel por *S. aureus* en ratones. En el caso de los estudios de colonización intranasal, el número de bacterias viables recuperadas de la nariz de ratones tratados con la formulación propuesta resultó 1,2 × 10^3 UFC mL^{-1}, un valor que fue significativamente menor que los correspondientes a la microemulsión sin carga, el cual fue 2,8 × 10^4 UFC mL^{-1}, y que el grupo control, el cual presentó 4,7 × 10^4 UFC mL^{-1}. Esto demostró que el tratamiento con CIP-ME provocó una reducción significativa de la colonización nasal de *S. aureus* en ratones.

Finalmente, en la última parte de la Tesis se planteó el diseño y obtención de un nuevo sistema del tipo microemulsión (o/w) basada en activos naturales con capacidad antioxidante y antiviral frente a betacoronavirus bovino (BCoV) y alfaherpesvirus bovino 1 (BoHV-1) para uso tópico. Para ello, se utilizó como fase oleosa aceite esencial de albahaca (AEA), el cual presenta comprobadas propiedades antivirales, una mezcla de Cremophor EL: etanol (CR:ET) como surfactante:co-surfactante y agua como fase acuosa. Se realizaron diagramas de fases pseudoternarios y los sistemas seleccionados se caracterizaron fisicoquímicamente y fueron sometidos a estudios de estabilidad acelerada que involucraron un test de centrifugación y ciclos de frío-calor. Luego se seleccionó el sistema óptimo, el cual estuvo compuesto por 5,0% de AEA, 30,0% de CR:ET (2:1) y 65,0% de agua. El mismo se cargó posteriormente con el antioxidante natural quercetina (QE) a una concentración final de 100 mg L^{-1}. La microemulsión cargada con quercetina

(QE-ME) presentó un tamaño de gota nanométrico de (17,47 ± 0,33) nm y un PdI de 0,049 ± 0,027. El valor de pH obtenido 4,69 ± 0,10 resultó adecuado para uso tópico. Con respecto a los valores de índice de refracción (1,3378 ± 0,0013) y conductividad eléctrica (0,101 ± 0,010) mS cm^{-1}, éstos corroboraron que QE-ME resultó ser un sistema isotrópico y de tipo (o/w), respectivamente. En este caso, el estudio de permeación se realizó mediante un nuevo método analítico miniaturizado denominado *mini*-Franz, que reemplazó a la tradicional celda de difusión de Franz por una celda estándar de cuarzo con un dispositivo portamembrana/portamuestra desarrollado con tecnología 3D, y un sistema de agitación magnética que se acopló directamente al portacelda de un espectrofotómetro UV-Vis. Esto permitió obtener los datos del proceso de permeación de QE-ME en tiempo real, reduciendo volumen de muestra y solución aceptora, y minimizando la generación de residuos. El valor de *Kp* obtenido ($5{,}96 \times 10^{-3} \pm 5{,}0 \times 10^{-7}$) cm h^{-1} resultó adecuado para su aplicación tópica. Además, se validó el nuevo método propuesto frente al método de difusión de Franz tradicional demostrando que no hubo diferencias estadísticamente significativas entre ambas metodologías. Por otro lado, se evaluó la eficacia antiviral de la formulación a través de diferentes ensayos *in-vitro*. Por un lado, se evaluó la citotoxicidad de la microemulsión sin carga (ME) y cargada con quercetina (QE-ME) en líneas celulares de adenocarcinoma rectal (HRT-18) y de riñón bovino (MDBK) para BCoV y BoHV-1, respectivamente. Luego, se realizó un ensayo de pre-tratamiento en el cual las monocapas celulares se expusieron a las microemulsiones y posteriormente fueron inoculadas con los virus en estudio. Por último, se evaluó la capacidad de las microemulsiones de adsorber los viriones de BCoV y BoHV-1 a través del ensayo de adsorción viral (*binding*). Con respecto al ensayo de pre-tratamiento, en ambos casos se observó una reducción significativa en los títulos virales en todos los grupos pre-tratados con microemulsiones, cargadas con quercetina como sin cargar, en comparación con el control positivo, es decir, monocapas celulares infectadas sin exposición previa a las microemulsiones. De la misma manera, el ensayo de *binding* para ambos virus demostró que las formulaciones evaluadas (ME y QE-ME) lograron reducir significativamente los títulos virales en comparación con el control no tratado con microemulsiones. Sin embargo, no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los títulos virales de BCoV y BoHV-1 obtenidos tras el tratamiento con las distintas microemulsiones, es decir, ME y QE-ME. Estos resultados mostraron que, bajo las condiciones ensayadas, la presencia de QE no mejoró la actividad antiviral de las microemulsiones en la concentración estudiada. Por último, se determinó la

capacidad antioxidante de ME y QE-ME mediante el método DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo). La microemulsión sin carga no presentó una tendencia definida en su actividad antioxidante con el aumento de la concentración, alcanzando un porcentaje máximo de inhibición cercano al 30%, dentro del rango de concentraciones evaluado. Por el contrario, QE-ME demostró una tendencia creciente en su capacidad de eliminación del radical DPPH, con valores de inhibición que aumentaron progresivamente hasta alcanzar un máximo de inhibición cercano al 92% con la concentración más alta estudiada (40 g L^{-1}). Este resultado fue comparable al obtenido con el control positivo (ácido ascórbico), con el que se consiguió un 93% de inhibición. Esto demostró que QE-ME presentó una significativa capacidad antioxidante.

Abstract

The development of new pharmaceutical and personal care products that offer multiple therapeutic actions -greater selectivity, prolonged efficacy, or reduced adverse effects on the body- remains a constant challenge in the fields of pharmaceutical and cosmetic research. However, issues related to the bioavailability and stability of various active molecules often arise, primarily due to limitations inherent to the delivery system or pharmaceutical form in which these molecules are incorporated. This underscores the need for designing novel carrier systems capable of enhancing therapeutic efficacy. In particular, there is a pressing need to foster the development of innovative, cost-effective formulations obtained through sustainable processes, which can be made accessible to various sectors of society and help address public health challenges. These include adverse effects associated with excessive solar exposure and infections caused by opportunistic pathogens, as well as issues impacting animal health and production, such as certain viral diseases affecting bovine livestock. Furthermore, the development of new formulations requires the implementation of analytical procedures for assessing their efficacy and stability. In this context, it becomes imperative to develop novel, environmentally sustainable analytical methodologies that can partially or entirely replace conventional analytical techniques, which often involve expensive and environmentally hazardous procedures.

Microemulsions are organized, dispersed systems composed of an oil phase, an aqueous phase, and a surfactant:co-surfactant mixture. They are transparent, optically isotropic, and thermodynamically stable. The presence of microdomains with varying polarity allows for the simultaneous solubilization of both hydrophilic and lipophilic compounds within a single formulation. Microemulsions have been employed as delivery systems for drugs and biocides to enhance their bioavailability and stability. These systems are capable of protecting labile compounds and enabling sustained and controlled release of the encapsulated active agent. Additionally, their preparation is simple, rapid, and requires low-energy processes, thereby contributing to overall sustainability.

Moreover, the route of drug administration is a critical factor influencing its pharmacokinetic properties, ultimately determining its efficacy and biological effect. The development of novel carrier systems aims to optimize the pharmacokinetic profile of the drug to minimize route-dependent adverse effects and improve its subsequent distribution within the body. Specifically, topical administration allows for localized drug application

at the site of action, thereby avoiding systemic absorption. This route is employed for the local treatment of skin conditions, circumventing hepatic first-pass metabolism and reducing fluctuations in plasma concentrations. It also ensures adequate drug absorption, decreases interindividual variability in uptake, prolongs the duration of action, and enhances patient compliance. Moreover, it is the route commonly used for applying various personal care products, such as sunscreens.

In the first part of this Thesis, a novel oil-in-water (o/w) microemulsion formulation was developed as a carrier for the chemical sunscreen agent benzophenone-3 (BZ3), using biocompatible materials commonly used in cosmetic product manufacturing. The components included isopropyl myristate (oil phase), Tween 80:ethanol (2:1) as the surfactant:co-surfactant mixture, and water (aqueous phase). Pseudoternary phase diagrams were constructed to identify various microemulsion systems, which were subsequently characterized through physicochemical methods. Based on these results, an optimal formulation was selected for the incorporation of BZ3 at 2.0% (w/w). The resulting formulation (BZ3-ME) consisted of 2.5% (w/w) isopropyl myristate, 42.0% (w/w) of the Tween 80:ethanol mixture (2:1), and 55.5% (w/w) water. This system exhibited a uniform size distribution (PdI = 0.224 ± 0.017) and nanometric droplet size (Z = 11.90 ± 0.93 nm). The measured pH (5.50 ± 0.03) was appropriate for topical application, while the refractive index (1.3350 ± 0.0002) and electrical conductivity (0.065 ± 0.010 mS) confirmed the isotropic nature and (o/w) type of the system, respectively. Subsequently, analytical studies were conducted to evaluate the thermal degradation of BZ3 at 60°C, comparing its behavior when loaded in the microemulsion (BZ3-ME) versus a non-organized medium (BZ3-NO). Detection was carried out using molecular fluorescence spectrometry, enabling real-time monitoring and the generation of corresponding thermal degradation profiles. The BZ3-NO profile showed a progressive decrease in BZ3 concentration over the analysis period, yielding a thermal degradation rate constant *Kt* of (0.069 ± 0.001) min^{-1}. In contrast, the BZ3-ME profile remained unchanged under the same conditions, indicating that the microemulsion system conferred a degree of protection against temperature-induced degradation of the chemical sunscreen agent. Additionally, an *in-vitro* permeation study of BZ3-ME was performed using the conventional Franz diffusion cell and UV-Vis molecular absorption spectrometry for detection. The permeation of BZ3 was monitored over 60 min using a synthetic cellulose acetate membrane. The cumulative concentration of BZ3 per unit area displayed a linear relationship with time, and the corresponding permeation constant *Kp*

was calculated as ($3.06 \times 10^{-3} \pm 4.0 \times 10^{-7}$) cm h^{-1}. This suggests that BZ3 exhibited an appropriate permeation profile in the proposed delivery system, comparable to values reported for the same active ingredient incorporated into other carrier systems in the literature. Finally, the efficacy of BZ3-ME was evaluated by determining its *in-vitro* sun protection factor ($SPF_{in\text{-}vitro}$), which was found to be 2.0. This value was expected given the concentration of the active agent and the fact that it was the only UV filter incorporated into the microemulsion.

In a second study, the previously developed microemulsion was employed as a carrier system for ciprofloxacin (CIP), a broad-spectrum antibiotic used to treat infections caused by the opportunistic pathogen *Staphylococcus aureus*. In this case, the microemulsion was successfully loaded with a final CIP concentration of 0.3% (w/w), which falls within the therapeutic range. The formulation (CIP-ME) was physicochemically characterized, and the results indicated that it was a monodisperse system (PdI = 0.259 ± 0.021) with nanometric droplet size (Z = 13.44 ± 0.24 nm), corroborated via transmission electron microscopy (TEM). Furthermore, the formulation exhibited a pH value of 5.32 ± 0.01, suitable for both topical and intranasal applications, and an osmolarity of 341.9 mOsm L^{-1}, appropriate for instillation. The distribution of CIP within the oil-in-water microemulsion was investigated using molecular fluorescence spectrometry, given the moderate solubility of the antibiotic in water. It was concluded that CIP localized preferentially at the oil-water interface, likely interacting with the surfactant component. Additionally, an *in-vitro* permeation study was conducted using a custom-designed, low-cost, real-time monitoring system based on Arduino electronics. This setup incorporated a standard Franz diffusion cell and allowed continuous monitoring of the CIP permeation process through a synthetic membrane simulating skin, using fluorescence spectroscopy. Spectral analysis enabled the acquisition of permeation profiles for CIP both within the microemulsion (CIP-ME) and in a non-organized medium (CIP-NO), from which the corresponding permeation constants *Kp* were calculated. The results revealed that the permeation kinetics of CIP in CIP-ME ($Kp = 2.76 \times 10^{-4} \pm 9.00 \times 10^{-6}$ cm·h^{-1}) were significantly greater than in CIP-NO ($Kp = 5.30 \times 10^{-5} \pm 5.00 \times 10^{-7}$ cm·h^{-1}), indicating that diffusion of CIP across the membrane was markedly enhanced in the microemulsion system. Finally, *in-vitro* and *in-vivo* biological studies were carried out to assess the antimicrobial activity of the proposed formulation using murine models of cutaneous and intranasal infection, in order to determine its therapeutic efficacy at the

site of infection. The effects of CIP-ME on the skin of mice infected with *S. aureus* were evaluated. After 24 h post-infection, a visible reduction in lesion size and erythema was observed in the affected area of mice treated with CIP-ME, compared to control group mice, which exhibited ulcerated and erythematous lesions with minimal exudate. Additionally, the number of viable bacteria recovered from the skin of CIP-ME–treated mice was significantly lower than in the control groups, demonstrating that treatment with CIP-ME significantly reduced *S. aureus* skin infection in the murine model. In the case of intranasal colonization studies, the number of viable bacteria recovered from the nasal cavity of mice treated with the proposed formulation was 1.2×10^3 CFU·mL^{-1}, a value significantly lower than that observed for the unloaded microemulsion (2.8×10^4 CFU·mL^{-1}) and the control group (4.7×10^4 CFU·mL^{-1}). These results confirmed that treatment with CIP-ME significantly reduced *S. aureus* nasal colonization in mice.

Finally, in the last part of this Thesis, the design and development of a new oil-in-water (o/w) microemulsion system based on natural active ingredients with antioxidant and antiviral properties against bovine betacoronavirus (BCoV) and bovine alphaherpesvirus 1 (BoHV-1) for topical use was proposed. Essential basil oil (EBO), known for its proven antiviral properties, was employed as the oil phase, while a mixture of Cremophor EL:ethanol (CR:ET) served as the surfactant:co-surfactant mixture, and water was used as the aqueous phase. Pseudoternary phase diagrams were constructed, and the selected systems were characterized physicochemically and subjected to accelerated stability tests, including centrifugation and thermal cycling. Based on these results, the optimal formulation was selected, consisting of 5.0% EBO, 30.0% CR:ET (2:1), and 65.0% water. This system was then loaded with the natural antioxidant quercetin (QE) at a final concentration of 100 mg L^{-1}. The resulting quercetin-loaded microemulsion (QE-ME) exhibited a nanoscale droplet size (17.47 ± 0.33 nm) and a low polydispersity index (PdI = 0.049 ± 0.027). The measured pH value (4.69 ± 0.10) was suitable for topical application. Additionally, the refractive index (1.3378 ± 0.0013) and electrical conductivity (0.101 ± 0.010 mS cm^{-1}) confirmed that QE-ME was an isotropic and oil-in-water type system. In this case, permeation was evaluated using a novel miniaturized analytical method termed *mini*-Franz, which replaced the traditional Franz diffusion cell with a standard quartz cuvette fitted with a 3D-printed membrane/sample holder and a magnetic stirring system coupled directly to a UV-Vis spectrophotometer cell holder. This setup enabled real-time monitoring of the QE-ME permeation process,

reducing sample and acceptor solution volumes, and minimizing waste generation. The obtained permeation coefficient ($Kp = 5.96 \times 10^{-3} \pm 5.0 \times 10^{-7}$ cm h^{-1}) was adequate for topical application. Furthermore, the proposed method was validated against the traditional Franz cell method, with no statistically significant differences observed between the two methodologies. The antiviral efficacy of the formulation was subsequently evaluated through various *in-vitro* assays. First, cytotoxicity of both the unloaded microemulsion (ME) and QE-loaded microemulsion (QE-ME) was assessed in rectal adenocarcinoma (HRT-18) and bovine kidney (MDBK) cell lines for BCoV and BoHV-1, respectively. A pre-treatment assay was then performed, where cell monolayers were exposed to the microemulsions prior to viral inoculation. Finally, a viral adsorption (binding) assay was conducted to assess the ability of the microemulsions to bind BCoV and BoHV-1 virions. In the pre-treatment assay, both ME and QE-ME significantly reduced viral titers in comparison with the positive control (i.e., infected monolayers not pre-exposed to microemulsions). Similarly, the binding assay revealed that both formulations significantly decreased viral titers compared to the untreated control. However, no statistically significant differences were found between ME and QE-ME, indicating that the presence of QE did not enhance the antiviral activity of the microemulsions at the tested concentration. Lastly, the antioxidant capacity of ME and QE-ME was evaluated using the DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) method. The unloaded microemulsion (ME) exhibited no defined trend in antioxidant activity with increasing concentration, with a maximum inhibition of approximately 30% within the tested concentration range. In contrast, QE-ME showed a clear dose-dependent antioxidant effect, achieving a maximum inhibition of 92% at the highest concentration tested (40 g L^{-1}), comparable to that of the positive control (ascorbic acid), which reached 93%. These results demonstrated that QE-ME possesses significant antioxidant activity.

INDICE GENERAL

Contenido

Objetivos ---- *2*
Capítulo 1 ---- *2*
1.1 Generalidades ---- 4
1.2 Emulsiones ---- 5
1.2.1 Nanoemulsiones ---- 7
1.2.2 Microemulsiones ---- 9
1.2.2.1 Surfactantes ---- 14
1.2.2.2 Co-surfactantes ---- 21
1.2.2.3 Fase oleosa ---- 22
1.2.2.4 Obtención de microemulsiones ---- 28
1.2.2.5 Diagramas de fases pseudoternario ---- 29
1.2.2.6 Caracterización fisicoquímica de las microemulsiones ---- 31
1.2.2.7 Morfología de las microemulsiones ---- 34
1.2.2.8 Microemulsiones como sistemas portadores de administración tópica --- 34
1.3 Estudios de permeación en piel ---- 37
1.3.1 Estudios de permeación *in-vivo* ---- 39
1.3.2 Estudios de permeación *in-vitro* ---- 40
1.4 Desarrollo de métodos analíticos aplicados a microemulsiones ---- 44
Capítulo 2 ---- *49*
2.1 Objetivos ---- 50
2.2 Introducción ---- 51
2.2.1 Filtros Solares ---- 52
2.2.1.1 Benzofenona-3 ---- 57
2.2.2 Factor de protección solar ---- 60
2.3 Parte Experimental ---- 62
2.3.1 Reactivos y soluciones ---- 62
2.3.2 Comportamiento de fases ---- 63
2.3.3 Caracterización fisicoquímica de las microemulsiones ---- 64
2.3.3.1 Tamaño de gota e índice de polidispersidad ---- 64
2.3.3.2 pH, índice de refracción y conductividad eléctrica ---- 64
2.3.4 Estudios de estabilidad ---- 65
2.3.4.1 Centrifugación ---- 65
2.3.4.2 Ciclos de enfriamiento-calentamiento ---- 65
2.3.5 Carga de benzofenona-3 y caracterización fisicoquímica ---- 65
2.3.6 Estudios analíticos ---- 66
2.3.6.1 Estudio de estabilidad térmica de benzofenona-3 ---- 66
2.3.6.2 Estudio de permeación de benzofenona-3 en la microemulsión ---- 66
2.3.7 Determinación del factor de protección solar *in-vitro* ---- 68

2.4 Resultados y discusión ---------- 68
2.4.1 Comportamiento de fases ---------- 68
2.4.2 Caracterización fisicoquímica de las microemulsiones ---------- 71
2.4.3 Estudio de estabilidad de las microemulsiones ---------- 73
2.4.4 Carga de benzofenona-3 y caracterización fisicoquímica ---------- 75
2.4.5 Estudios analíticos ---------- 76
2.4.5.1 Estudio de estabilidad térmica de benzofenona-3 cargada en la microemulsión ---------- 76
2.4.5.2 Estudio de permeación de de benzofenona-3 cargada en la microemulsión ---------- 81
2.4.6 Factor de protección solar *in-vitro* ---------- 86
2.5 Conclusiones parciales ---------- 86
Capítulo 3 ---------- *88*
3.1 Objetivos ---------- 89
3.2 Introducción ---------- 90
3.3 Parte Experimental ---------- 94
3.3.1 Reactivos y soluciones ---------- 94
3.3.2 Obtención y carga de las microemulsiones ---------- 96
3.3.3 Caracterización fisicoquímica de las microemulsiones ---------- 96
3.3.4 Morfología de las microemulsiones ---------- 97
3.3.5 Estudios analíticos ---------- 97
3.3.5.1 Estudio de la distribución de ciprofloxacina en la microemulsión ---------- 97
3.3.5.2 Estudio de permeación on-line ---------- 98
3.3.6 Estudios de actividad antibacteriana ---------- 99
3.3.6.1 Cepas y condiciones de crecimiento bacteriano ---------- 99
3.3.6.2 Concentración inhibitoria mínima ---------- 99
3.3.6.3 Actividad anti-biofilm ---------- 100
3.3.6.4 Estudios de eficacia terapéutica *in-vivo* mediante un modelo murino - 102
3.3.6.4.1 Estudio de colonización nasal ---------- 102
3.3.6.4.2 Estudio de infección cutánea ---------- 103
3.4 Resultados y Discusión ---------- 106
3.4.1 Obtención, caracterización fisicoquímica y morfología de las microemulsiones ---------- 106
3.4.2 Estudio de la distribución de ciprofloxacina en la microemulsión -------- 108
3.4.3 Estudio analítico de permeación ---------- 109
3.4.3.1 Sistema automático on-line ---------- 109
3.4.3.2 Análisis espectral y determinación de las constantes de permeación -- 110
3.4.3.3 Estudio de la permeación de CIP-ME a lo largo del tiempo ---------- 113
3.4.4 Estudio de la actividad antibacteriana ---------- 114
3.4.5 Estudios de eficacia terapéutica *in-vivo* mediante un modelo murino --- 115
3.4.5.1 Colonización nasal ---------- 115
3.4.5.2 Infección cutánea ---------- 117
3.5 Conclusiones Parciales ---------- 119

Capítulo 4----*121*
4.1 Objetivos ----122
4.2 Introducción ----123
4.3 Parte Experimental----130
4.3.1 Reactivos y soluciones ----130
4.3.2 Obtención de microemulsiones----131
4.3.3 Caracterización fisicoquímica de las microemulsiones obtenidas --------132
4.3.3.1 Determinación del tamaño de gota e índice de polidispersidad ----------132
4.3.3.2 Medición de pH, índice de refracción y conductividad eléctrica----------132
4.3.4 Estudio de estabilidad de las microemulsiones----------133
4.3.5 Caracterización química del aceite esencial de albahaca ----------133
4.3.6 Carga de quercetina en la microemulsión y caracterización fisicoquímica ----------133
4.3.7 Estudio analítico de permeación----------134
4.3.7.1 Celda de difusión mini-Franz ----------134
4.3.7.2 Procedimiento de permeación----------135
4.3.8 Ensayos antivirales *in-vitro*----------135
4.3.8.1 Ensayos con betacoronavirus bovino----------137
4.3.8.2 Ensayos con alfaherpesvirus bovino 1 ----------139
4.3.9 Ensayo de capacidad antioxidante ----------140
4.4 Resultados y discusión ----------142
4.4.1 Comportamiento de fases----------142
4.4.2 Caracterización fisicoquímica de las microemulsiones----------143
4.4.3 Estudio de estabilidad ----------145
4.4.4 Caracterización química del aceite esencial de albahaca ----------148
4.4.5 Carga de quercetina y caracterización fisicoquímica ----------150
4.4.6 Estudio analítico de permeación----------152
4.4.7 Estudios de actividad antiviral para BCoV----------155
4.4.7.1 Ensayo de citotoxicidad ----------155
4.4.7.2 Pre-tratamiento de las monocapas celulares con microemulsiones ------156
4.4.7.3 Adsorción viral de las microemulsiones----------157
4.4.8 Estudios de actividad antiviral para BoHV-1----------158
4.4.8.1 Ensayo de citotoxicidad ----------158
4.4.8.2 Pre-tratamiento de las monocapas celulares con microemulsiones ------160
4.4.8.3 Adsorción viral a las microemulsiones ----------161
4.4.9 Capacidad antioxidante de las microemulsiones----------162
4.5 Conclusiones Parciales ----------163
CAPÍTULO 5----*165*
5.1 Conclusiones generales ----166
Apéndice ----*169*
Apéndice I ----*170*
Valores de la composición de varios puntos del sistema ME del capítulo 2 utilizados en la construcción del diagrama de fases pseudoternario.----------170

Apéndice II----------*174*
Valores de la composición de varios puntos del sistema ME del capítulo 4 utilizados en la construcción del diagrama de fases pseudoternario.----------174
Apéndice III ----------*177*
Productividad durante la tesis ----------177
III.1 Trabajos publicados ----------177
III.2 Presentaciones a congresos relacionados con la tesis ----------178
III.3 Otras presentaciones a congresos ----------179

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1. Procesos relacionados con la inestabilidad de las emulsiones. ----------7
Figura 1.2. A) Representación esquemática de una microemulsión (w/o) donde un aceite es la fase continua. B) Representación esquemática de una microemulsión (o/w) donde el agua es la fase continua.---------- 10
Figura 1.3. Representación esquemática de la disminución del área interfacial de un sistema disperso por efecto del agregado de un co-surfactante. ---------- 12
Figura 1.4. Estructura de los distintos tipos de microemulsiones: aceite en agua (o/w), bicontinua y agua en aceite (w/o). En celeste se representa la fase acuosa en cada caso.---------- 13
Figura 1.5. Esquema de la estructura básica de un surfactante. ---------- 14
Figura 1.6. Estructura básica de los distintos tipos de surfactantes. A) Surfactante catiónico B) Surfactante aniónico C) Surfactante anfótero D) Surfactante no-iónico ---------- 18
Figura 1.7. Porcentaje promedio de ácidos grasos en la epidermis de la piel humana en condiciones normales. Entre paréntesis se especifica el número de carbonos y enlaces insaturados, respectivamente. ---------- 24
Figura 1.8. Diagrama de fases pseudoternario donde las diferentes regiones representan distintos tipos de sistemas coloidales incluyendo las microemulsiones. Cada eje representa la proporción de cada componente, es decir, fase acuosa, fase oleosa y mezcla surfactante:co-surfactante.---------- 30
Figura 1.9. Imágenes obtenidas por TEM correspondientes a una microemulsión (o/w) portadora del filtro químico solar octil p-metoxicinamato desarrollada por Volpe y col. Puede evidenciarse la morfología esférica de las gotas y una distribución de tamaño relativamente uniforme.---------- 34
Figura 1.10. Esquema de las diferentes capas de la epidermis. ---------- 38
Figura 1.11. Representación esquemática de una celda de difusión de Franz utilizada para llevar a cabo estudios de permeación in-vitro de formulaciones. ---------- 41
Figura 1.12. Los doce principios de la Química Analítica Verde (GAC). ---------- 46
Figura 2.1. Estructura química del filtro solar benzofenona-3 (BZ3). ---------- 57
Figura 2.2. Estructura química del miristato de isopropilo (MIP) utilizado como fase oleosa de las microemulsiones propuestas.---------- 63
Figura 2.3. Estructura química de Polisorbato 80 o Tween 80 (TW80) utilizado como surfactante no-iónico de las microemulsiones propuestas.---------- 63
Figura 2.4 Fotografía de la celda de difusión de Franz convencional. A) Componentes del sistema antes del armado. BM: brazo muestreador; CA: compartimento aceptor; CD: compartimento donador; MS: membrana sintética. B) Sistema ensamblado. AM: agitador magnético; PA: pinza de agarre.---------- 67
Figura 2.5. Diagramas de fases pseudoternarios obtenidos por la combinación de agua, fase oleosa (MIP) y una mezcla de surfactante:co-surfactante (TW80:ET) en relación: A) 1:1; B) 2:1 y C) 3:1.---------- 70
Figura 2.6. Fotografías de mezclas correspondientes al diagrama pseudoternario de fases con una relación surfactante:co-surfactante 2:1. A) Sistema correspondiente a una microemulsión. B) Sistema correspondiente a un punto fuera de la región de formación de microemulsiones. ---------- 71

Figura 2.7. A) Gráfico de la distribución del tamaño de gota de BZ3-ME obtenida por DLS. B) Gráfico del barrido de potencial de BZ3-ME. ---------- 76
Figura 2.8. Espectros de fluorescencia molecular obtenidos durante el proceso de termodegradación a 60°C y durante 90 min. A) BZ3-NO y B) BZ3-ME. -------- 78
Figura 2.9. Perfiles de concentración correspondientes a la termodegradación a 60°C de BZ3 durante 90 min cuando se encuentra en: A) un medio no-organizado (BZ3-NO) y B) ME2 (BZ3-ME). Los puntos representan el valor promedio de tres determinaciones (n=3).---------- 79
Figura 2.10 Curva de termodegradación de BZ3 en un medio no-organizado (BZ3-NO) obtenida ajustando los datos a un modelo de cinética de primer orden. Los puntos representan el valor promedio de tres determinaciones (n=3). -- 80
Figura 2.11. A) Espectros de absorción molecular de BZ3 (línea azul), ME2 (línea naranja) y BZ3-ME (línea gris). B) Curva de calibrado de BZ3 en un rango de concentración entre 0,8-8,0 mg L^{-1}. Los puntos representan el valor promedio de tres determinaciones (n=3). ---------- 82
Figura 2.12 Perfil de permeación representado como cantidad de BZ3 acumulada por unidad de área (cm^2) en función del tiempo cuando BZ3 se encuentra cargado en ME2. Los puntos representan el valor promedio de tres determinaciones (n=3).---------- 83
Figura 3.1. Estructura química del antibiótico de amplio espectro ciprofloxacina (CIP).---------- 92
Figura 3.2. Sistema de flujo continuo automático acoplado a una celda de difusión de Franz con detección fluorescente desarrollado en el laboratorio. Las flechas indican la dirección de los fluidos. El procedimiento estuvo comandado por Arduino. AM: agitador magnético; BP: bomba peristáltica; BT: baño termostatizado; CF: celda de difusión de Franz; D: desechos; EF: espectrofluorímetro; MS: membrana sintética; MU: muestra; SA: solución aceptora. ---------- 99
Figura 3.3. Fotografías representativas del estudio de infección cutánea. A) Ratón CF1 de ocho semanas de edad, en condiciones basales. B) Selección del área dorsal seleccionada para el estudio C) Zona delimitada tras el rasurado, previo a la inoculación. D) Inoculación con una suspensión bacteriana de aproximadamente 7×10^8 UFC mL^{-1} de la cepa *S. aureus* MW2. ----------105
Figura 3.4. Formulación CIP-ME conformada por MIP (2,5%), Smix (42,0%) y agua (55,5%) y cargada con un 0,30% (p/p) del antibiótico CIP. ----------106
Figura 3.5. Caracterización fisicoquímica de la microemulsión cargada con el antibiótico CIP (CIP-ME). A) Gráfico de la distribución del tamaño de gota de CIP-ME obtenida por DLS. B) Gráfico del barrido de potencial de CIP-ME. Las determinaciones se realizaron por triplicado (n = 3) ----------107
Figura 3.6. Microfotografías obtenidas por TEM en las cuales puede apreciarse la morfología y tamaño de las microgotas de CIP-ME. A) Aumento de 100.000X; B) Aumento de 270.000X.----------108
Figura 3.7. Espectros de fluorescencia molecular de CIP-ME (rojo; max=448 nm) y de CIP en cada uno de los componentes de la microemulsión: CIP-agua (celeste, max=449 nm), CIP-MIP (verde; max=431 nm) y CIP-Smix (violeta; max=445 nm). ----------109
Figura 3.8. Espectros de emisión de fluorescencia molecular obtenidos a lo largo del proceso de permeación (90 min) correspondientes a: A) CIP en un medio no-organizado (CIP-NO) y B) CIP cargada en la microemulsión propuesta (CIP-

ME). Las flechas indican el aumento de la señal a lo largo del tiempo debido al aumento de la concentración de CIP en la solución aceptora.----------111
Figura 3.9. A) Espectros de fluorescencia molecular de las soluciones testigos de CIP cuya máxima intensidad de fluorescencia se registró a 417 nm. B) Curva de calibrado de CIP en un rango de concentraciones entre 0,37 - 18,00 mg L^{-1}. Cada experimento fue realizado por triplicado (n = 3).----------112
Figura 3.10. Perfiles de permeación obtenidos para CIP cuando se encuentra en un medio no-organizado (CIP-NO; naranja) y en la microemulsión propuesta (CIP-ME; azul) luego de un ajuste logarítmico (ln) de la concentración de CIP en función del tiempo. Los puntos representan el valor promedio de tres determinaciones (n=3).----------112
Figura 3.11. Perfiles de permeación obtenidos y valores de *Kp* correspondientes a CIP en CIP-ME luego de 1 día (azul), 15 días (verde) y 30 días (naranja) de almacenamiento de la formulación al abrigo de la luz y a 25°C. Además, se muestra el perfil de CIP-NO (gris) el cual no mostró diferencias a lo largo de los días. Los puntos representan el valor promedio de tres determinaciones (n=3). ----------114
Figura 3.12. Resultados del estudio de actividad anti-biofilm de la microemulsión sin carga (ME) y de la formulación CIP-ME. Como control se utilizó una cepa de *S. aureus* sin tratamiento. Cada barra representa la media con su correspondiente desviación estándar de 6 pocillos de 3 experimentos independientes. Los biofilms fueron cuantificados espectrofotométricamente por tinción con violeta cristal. Las líneas horizontales muestran las comparaciones estadísticas. P <0,0001 se consideraron significativas (prueba de Mann-Whitney). ----------115
Figura 3.13. Resultados del estudio de colonización nasal por *S. aureus* en un modelo murino. Cada punto corresponde a un ratón individual. Las líneas horizontales representan el valor medio de UFC mL^{-1} en las fosas nasales. Comparación entre el grupo tratado con microemulsión sin carga (ME), CIP-ME y el grupo control (prueba de Mann-Whitney; p = 0,04).----------116
Figura 3.14. Ensayo murino de infección cutánea utilizando la cepa de *S.aureus* MW2. A) Fotografía representativa de lesiones correspondientes a ratones infectados con *S. aureus* y posteriormente tratados con 100 µL de CIP-ME. B) Fotografía representativa de las lesiones correspondientes a ratones del grupo control (ratones infectados con *S. aureus* y tratados con 100 µL de PBS). ----------118
Figura 3.15. Resultados del recuento de UFC luego del tratamiento con ME y CIP-ME correspondiente al estudio de infección cutánea en un modelo murino. Los ratones se infectaron con una suspensión (~ 7×10^8 CFU) de *S. aureus* MW2 por vía subcutánea. Cada punto representa un ratón individual. Las líneas horizontales representan el valor medio de log UFC/g piel.----------119
Figura 4.1. Estructura química del flavonoide quercetina (QE). ----------129
Figura 4.2. Estructura química del macrogolglicerol ricinooleato denominado comercialmente Cremophor EL (CR). ----------131
Figura 4.3. A) Celda de difusión miniaturizada mini-Franz construída en el laboratorio. B) Acoplamiento de la celda de difusión miniaturizada y el agitador magnético a un espectrofotómetro UV-Vis para el monitoreo del proceso de permeación en tiempo real.----------135

Figura 4.4. Diagramas de fases pseudoternarios construidos con diferentes relaciones de fase oleosa (AEA), fase acuosa y Smix (CR:ET). A) Smix con una relación surfactante:co-surfactante 1:1. B) Smix con una relación surfactante:co-surfactante 2:1. ----------143
Figura 4.5. Gráficos de distribución de tamaño obtenidos por DLS y correspondientes a las muestras de microemulsiones ME1 a ME5 las cuales fueron sometidas a ciclos de frío-calor (4-40°C) durante 4 días consecutivos. Las determinaciones fueron realizadas por triplicado (n= 3). ----------147
Figura 4.6. Cromatograma del AEA utilizado en la síntesis de las microemulsiones propuestas obtenido por CG-MS. El pico que se destaca corresponde al compuesto mayoritario encontrado, estragol (93,2%), el cual presentó un tiempo de retención de 22,77 min.----------150
Figura 4.7. A) Formulación QE-ME conformada por AEA (5,0%), Smix (30,0%) y agua (65,0%) y cargada con el flavonoide QE en una concentración de 100 mg L^{-1}. La misma puede apreciarse transparente y además resultó estable. B) Gráfica de distribución del tamaño de gota de QE-ME obtenida por DLS en la cual puede presumirse la presencia de un sistema monodisperso. Las determinaciones fueron realizadas por triplicado (n= 3). ----------151
Figura 4.8. A) Curva de calibrado utilizada para cuantificar la concentración de QE-ME en la solución aceptora. B) Curvas de permeación de QE-ME (orden cero) obtenidas utilizando la celda de difusión mini-Franz propuesta (azul) y la celda de difusión de Franz tradicional (naranja). Cada punto representa la media (n=3) de tres determinaciones. ----------154
Figura 4.9. Porcentajes de viabilidad de células HRT-18 expuestas a microemulsiones sin diluir y diluidas (1:10). Las barras representan el porcentaje de células viables con respecto al control (100%) luego de 24 h de exposición a las distintas muestras. La línea punteada (naranja) representa el porcentaje de viabilidad celular a partir del cual las muestras no son consideradas citotóxicas.----------156
Figura 4.10. Títulos de BCoV luego de 24 y 48 h del pre-tratamiento de células HRT-18 durante 1 h con la microemulsión sin carga (ME3) y la microemulsión cargada con quercetina (QE-ME). Los datos representan la media y los desvíos estándar de tres ensayos independientes. El asterisco (*) indica que no se presentaron diferencias significativas entre las muestras ($p > 0,05$). ---------157
Figura 4.11. Títulos de BCoV en células HRT-18 luego de 30 min de adsorción viral con la microemulsión sin carga (ME3) y la microemulsión cargada con quercetina (QE-ME). Los datos representan la media y los desvíos estándar de tres ensayos independientes. El asterisco (*) indica que no se presentaron diferencias significativas entre las muestras ($p > 0,05$).----------158
Figura 4.12. Porcentajes de viabilidad de células MDBK expuestas a microemulsiones sin diluir y diluidas (1:10). Las barras representan el porcentaje de células viables con respecto al control (100%) luego de 24 h de exposición a las distintas muestras. La línea punteada (naranja) representa el porcentaje de viabilidad celular a partir del cual las muestras no son consideradas citotóxicas.----------160
Figura 4.13. Títulos de BoHV-1 luego de 24 h del pre-tratamiento de células MDBK durante 1 h con la microemulsión sin carga (ME3) y la microemulsión cargada con quercetina (QE-ME). Los datos representan la media y los desvíos

estándar de tres ensayos independientes. El asterisco (*) indica que no se presentaron diferencias significativas entre las muestras (p > 0,05). ---------161
Figura 4.14. Títulos de BoHV-1 en células MDBK luego de 30 min de adsorción viral con la microemulsión sin carga (ME3) y la microemulsión cargada con quercetina (QE-ME). Los datos representan la media y los desvíos estándar de tres ensayos independientes. El asterisco (*) indica que no se presentaron diferencias significativas entre las muestras (p > 0,05).----------162
Figura 4.15. Porcentajes de inhibición del radical DPPH a distintas concentraciones de ME3 (azul) y QE-ME (naranja) con respecto al control de AA (gris). Cada barra representa el porcentaje de inhibición promedio acompañados de su correspondiente desviación estándar (n=3). ----------163

Lista de Tablas

Tabla 1.1. Principales diferencias entre sistemas dispersos del tipo de las emulsiones, nanoemulsiones y microemulsiones. ---------- 13
Tabla 1.2. Valores de HLB de diferentes tipos de surfactantes según Griffin. ------ 19
Tabla 1.3. Aplicaciones de los surfactantes según su rango de HLB. ---------- 20
Tabla 1.4. Valores de contribución para grupos funcionales presentes en la estructura de surfactantes y utilizados para el cálculo del HLB. ---------- 21
Tabla 1.5. Características químicas y propiedades de aceites minerales y ceras utilizados en cosmética. ---------- 25
Tabla 1.6. Principales tipos de compuestos y activos presentes en aceites esenciales y sus potenciales efectos terapéuticos. ---------- 27
Tabla 1.7. Microemulsiones recientemente reportadas como sistemas portadores de uso tópico de acción farmacéutica y cosmética. ---------- 36
Tabla 1.8. Tipos de membranas y soluciones aceptoras usadas en estudios de permeación de formulaciones. ---------- 42
Tabla 2.1. Lista de filtros UV permitidos por el MERCOSUR para productos de higiene personal, cosméticos y perfumes. ---------- 53
Tabla 2.2. Valores de factor de protección solar (FPS) y composición de formulaciones comerciales que contienen BZ3. ---------- 58
Tabla 2.3. Constantes para cada longitud de onda (λ) correspondientes al producto entre el efecto eritemogénico y la intensidad de la radiación determinadas por Sayre y col. para el cálculo del FPS in-vitro. ---------- 61
Tabla 2.4. Composición de las cinco probables microemulsiones seleccionadas con una relación Smix 2:1.---------- 71
Tabla 2.5. Caracterización fisicoquímica de los sistemas seleccionados (ME1 a ME5) con una relación surfactante:cosurfactante (TW80:ET) 2:1. Todas las determinaciones fueron realizadas por triplicado (n=3). ---------- 73
Tabla 2.6. Resultados del estudio de estabilidad basado en centrifugación y ciclos frío-calor llevado a cabo para las microemulsiones seleccionadas (ME1-ME5). Todas las determinaciones fueron realizadas por triplicado (n=3). ---------- 74
Tabla 2.7. Constantes de permeación de BZ3 obtenidas en distintos trabajos publicados en la literatura cuando se encuentra cargada en diferentes sistemas portadores. ---------- 84
Tabla 3.1 Modelos y parámetros de ajuste para los perfiles de permeación de CIP en CIP-NO y en CIP-ME junto con las correspondientes constantes de permeación (n = 3).----------113
Tabla 4.1. Principales componentes del AEA y sus correspondientes actividades/propiedades terapéuticas. Adaptada de K. Dhama y col. ---------127
Tabla 4.2. Composición de las microemulsiones seleccionadas (ME1 a ME5) correspondientes a una relación 2:1 de CR:ET. ----------144
Tabla 4.3. Caracterización fisicoquímica de las microemulsiones seleccionadas (ME1 a ME5) con una relación surfactante:co-surfactante (CR:ET) de 2:1. Las determinaciones fueron realizadas por triplicado (n=3) y cada valor está acompañado de su correspondiente desviación estándar.----------145
Tabla 4.4. Resultados del estudio de estabilidad de las muestras ME1 a ME5. Los valores de Z y PdI fueron obtenidos por DLS durante los días que se llevaron a cabo los ciclos de enfriamiento-calentamiento. Las medidas fueron realizadas

por triplicado (n=3) y cada valor está acompañado con su correspondiente desviación estándar.----------145
Tabla 4.5. Resultados del análisis por CG-MS del AEA utilizado en la síntesis de las microemulsiones propuestas. Las filas coloreadas corresponden a los principales componentes activos encontrados (1,8-cineol, linalool y estragol). ----------149
Tabla 4.6. Modelos y parámetros de ajuste para los perfiles de permeación de QE-ME y las correspondientes constantes de permeación obtenidas utilizando la celda de difusión mini-Franz propuesta y la celda de difusión de Franz tradicional. ----------155
Tabla 4.7. Viabilidad de monocapas de células HRT-18 cuando son expuestas a la microemulsión sin carga (ME3) y cargada con QE (QE-ME), tanto diluídas (1:10) como sin diluir. Los datos representan la media y los desvíos estándar de tres ensayos independientes.----------155
Tabla 4.8. Viabilidad de monocapas de células MDBK cuando son expuestas a la microemulsión sin carga (ME3) y cargada con QE (QE-ME), tanto diluídas (1:10) como sin diluir. Los datos representan la media y los desvíos estándar de tres ensayos independientes.----------159
Tabla I.1 Composición (% p/p) de los componentes del sistema tipo ME (o/w) para la mezcla (TW80:ET) 1:1----------171
Tabla I.2 Composición (% p/p) de los componentes del sistema tipo ME (o/w) para la mezcla (TW80:ET) 2:1. ----------171
Tabla I.3 Composición (% p/p) de los componentes del sistema tipo ME (o/w) para la mezcla (T80:ET) 3:1.----------172
Tabla II.1. Composición (% p/p) de los componentes del sistema tipo ME (o/w) para la mezcla (CR:ET) 1:1.----------175
Tabla II.2 Composición (% p/p) de los componentes del sistema tipo ME (o/w) para la mezcla (CR:ET) 2:1.----------175

Objetivos

Diseño y estudios analíticos de microemulsiones portadoras de fármacos y biocidas

Objetivos

El presente trabajo de Tesis tiene como objetivo principal el desarrollo de sistemas nanoestructurados innovadores y eficaces, específicamente microemulsiones del tipo aceite en agua (o/w), que sean aptos como portadores de diversos compuestos activos de interés en el campo cosmético y farmacéutico, y que contribuyan a resolver problemas de relevancia en el ámbito de la salud pública, como ser la exposición solar y las infecciones por bacterias oportunistas, y la sanidad animal, como ciertas infecciones virales que afectan al ganado bovino. Para ello, se apunta a la obtención y caracterización fisicoquímica de formulaciones a partir de materiales biocompatibles para su potencial aplicación tópica tanto en humanos como en animales. Además, se pretende evaluar la eficacia de los sistemas propuestos mediante diversos estudios analíticos con un enfoque sustentable, empleando metodologías avanzadas basadas en técnicas de flujo, tecnología 3D y técnicas espectroscópicas las cuales están alineadas con varios de los principios de la *Química Analítica Verde*. Finalmente, el objetivo es evaluar la eficacia terapéutica de las formulaciones propuestas mediante ensayos *in-vitro* e *in-vivo* incluyendo determinación del factor de protección solar, estudios de capacidad antioxidante, y estudios de actividad antibacteriana y antiviral.

Capítulo 1

Introducción

1.1 Generalidades

En la búsqueda de mejorar la prevención, el diagnóstico y/o el tratamiento de diversas enfermedades, el uso de la nanotecnología resulta un recurso sumamente útil para lograr tales fines. Mientras que la nanotecnología permite el conocimiento de la materia en dimensiones dentro del rango nanométrico[1], la aplicación de esta rama de la ciencia en el campo farmacéutico y cosmético es de gran interés para direccionar activos al órgano blanco de manera específica, atravesar las barreras biológicas, aumentar la biodisponibilidad, mejorar la estabilidad e incluso minimizar efectos secundarios o adversos[2,3].

Se define como material nanoestructurado a aquel que contiene al menos una de sus dimensiones en la escala nanométrica[4]. Dentro de estos materiales podemos incluir a las nanopartículas, las cuales son partículas sólidas coloidales formadas generalmente a partir de compuestos biodegradables que contienen al menos una dimensión inferior a 1000 nm[5]. Existen diversos tipos de nanopartículas de interés farmacéutico dentro de las que podemos destacar a las nanocápsulas, las cuales son sistemas vesiculares de forma generalmente esférica que permiten encapsular fármacos, enzimas u otros componentes en su interior, ya sea en forma disuelta o bien adsorbidos en la superficie del núcleo[6]. Otro tipo de nanopartícula son las nanoesferas, las cuales presentan una matriz formada a partir de polímeros donde se encuentra disperso el principio activo, ya sea en la superficie,

[1] Adams, F. C., & Barbante, C. (2013). Nanoscience, nanotechnology and spectrometry. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, *86*, 3-13.
[2] Sharma, A., Agarwal, P., Sebghatollahi, Z., & Mahato, N. (2023). Functional nanostructured materials in the cosmetics industry: A review. *ChemEngineering*, 7(4) 66.
[3] Harish, V., Tewari, D., Gaur, M., Yadav, A. B., Swaroop, S., Bechelany, M., & Barhoum, A. (2022). Review on nanoparticles and nanostructured materials: Bioimaging, biosensing, drug delivery, tissue engineering, antimicrobial, and agro-food applications. *Nanomaterials*, 12(3), 457.
[4] Rafique, M., Tahir, M. B., Rafique, M. S., Safdar, N., & Tahir, R. (2020). Nanostructure materials and their classification by dimensionality. En *Nanotechnology and photocatalysis for environmental applications* (pp. 27-44). Elsevier.
[5] Islam, S., Ahmed, M. M. S., Islam, M. A., Hossain, N., & Chowdhury, M. A. (2025). Advances in Nanoparticles in Targeted Drug Delivery-A Review. *Results in Surfaces and Interfaces*, 100529.
[6] Mora-Huertas, C. E., Fessi, H., & Elaissari, A. (2010). Polymer-based nanocapsules for drug delivery. *International journal of pharmaceutics*, *385*(1-2), 113-142.

atrapado o disuelto en la misma. Son partículas esféricas y generalmente poseen un diámetro que puede llegar hasta 200 nm[7].

Por otro lado, un tipo de material nanoestructurado de gran aplicación en el diseño de nuevos productos farmacéuticos y de cuidado personal (PFCP) son los sistemas dispersos, los cuales están conformados por una fase dispersa y una fase continua o medio dispersante. La fase dispersa está constituida por un soluto (sólido o líquido) dispersado en la fase continua, generalmente un medio líquido acuoso u orgánico[8]. De esta manera encontramos sistemas dispersos del tipo de las suspensiones, las cuales son preparados líquidos constituidos por principios activos sólidos e insolubles dispersos en un vehículo adecuado, generalmente estabilizados por surfactantes[9], y sistemas vesiculares, los cuales son estructuras coloidales compuestas por una membrana bimolecular que contienen surfactantes. Estos últimos en presencia de un medio acuoso en exceso, se cierran encapsulando en su interior dicho medio. En base a los elementos o componentes que pueden encapsular, los sistemas vesiculares pueden clasificarse en liposomas, proteosomas, virusomas, niosomas, entre otros[10]. Por último, un tipo de sistema disperso con particulares y excelentes características fisicoquímicas son las emulsiones.

1.2 Emulsiones

Son sistemas constituidos por la dispersión fina de una fase líquida en otra en la cual es inmiscible o parcialmente inmiscible[11]. Habitualmente ambas fases (dispersante y dispersa) son líquidas, siendo las más utilizadas el agua y diferentes aceites o solventes orgánicos comúnmente denominados fase oleosa. Las gotas formadas son generalmente esféricas y poseen un diámetro que puede oscilar entre 200 nm a 100 µm. Se denomina

[7] Vauthier, C., & Bouchemal, K. (2009). Methods for the preparation and manufacture of polymeric nanoparticles. *Pharmaceutical research*, 26, 1025-1058.
[8] Brunaugh, A. D., Moraga-Espinoza, D., Bahamondez-Canas, T., Smyth, H. D., & Williams, R. O. (2024). Disperse Systems: Suspensions. In *Essential Pharmaceutics* (pp. 109-129). Cham: Springer International Publishing.
[9] Rajora, A., & Nagpal, K. (2025). Suspensions: Theory, Formulation Considerations, Flocculated and Deflocculated Suspensions, and Evaluation of Suspension Stability. En *Advances in Pharmaceutical Product Development* (pp. 199-218). Singapore: Springer Nature Singapore.
[10] Paliwal, H., Prajapati, B. G., & Srichana, T. (2025). Nanotechnology-Based Drug Delivery Systems for the Treatment of Neurodegenerative Disorders. *Nanomedicine for Neurodegenerative Disorders: Selective Treatment Strategies*, 147
[11] Kapolos, J., Giannopoulou, D., Papadimitriou, K., & Koliadima, A. (2025). A Comprehensive Review of Emulsion-Based Nisin Delivery Systems for Food Safety. *Foods*, 14(8), 1338.

emulsión aceite/agua (o/w) cuando la fase dispersante es el agua. Por el contrario, si la fase dispersante es el aceite, la emulsión es agua/aceite (w/o). Las emulsiones son sistemas termodinámicamente inestables ya que existe una elevada tensión interfacial entre las fases que constituyen estos sistemas. Esto puede llevar a la ruptura o separación de fases a lo largo del tiempo, lo cual puede darse mediante cuatro procesos diferentes. Por un lado, puede producirse la sedimentación, un proceso causado por la acción de la gravedad mediante el cual se produce un gradiente vertical de concentración de las gotas sin variar la distribución del tamaño de las mismas. Otro fenómeno que puede ocurrir en las emulsiones a lo largo del tiempo es la floculación, donde las gotas se adhieren, aunque sin fusionarse, sin producir variación en su distribución de tamaño. Este proceso está controlado por un equilibrio global entre las fuerzas de atracción electrostáticas de van der Waals, y fuerzas repulsivas (estéricas y/o de hidratación). Cuando las gotas se fusionan obteniéndose gotas de mayor tamaño perdiéndose así la interfase líquido/líquido, ocurre el fenómeno de coalescencia. Este proceso es irreversible por lo que se requiere un aporte extra de energía para restablecer la distribución de tamaño de la partícula original. Por otro lado, puede darse lugar a un engrosamiento de gotas, donde las gotas de mayor tamaño crecen a costa de las más pequeñas hasta que éstas últimas prácticamente desaparecen. La velocidad de este proceso depende de la solubilidad de la fase dispersa en la fase continua y se debe a que la presión interna de las gotas (presión de Laplace) es mayor en las gotas más pequeñas.

Así, la inestabilidad de las emulsiones suele ocurrir mediante la combinación de estos posibles procesos que pueden suceder simultáneamente y a diferentes velocidades[12], tal como se muestra en la Figura 1.1.

[12] Kilpatrick, P.K. (2012). Water-in-Crude Oil Emulsion Stabilization: Review and Unanswered Questions. *Energy Fuels*, 26, 4017–4026.

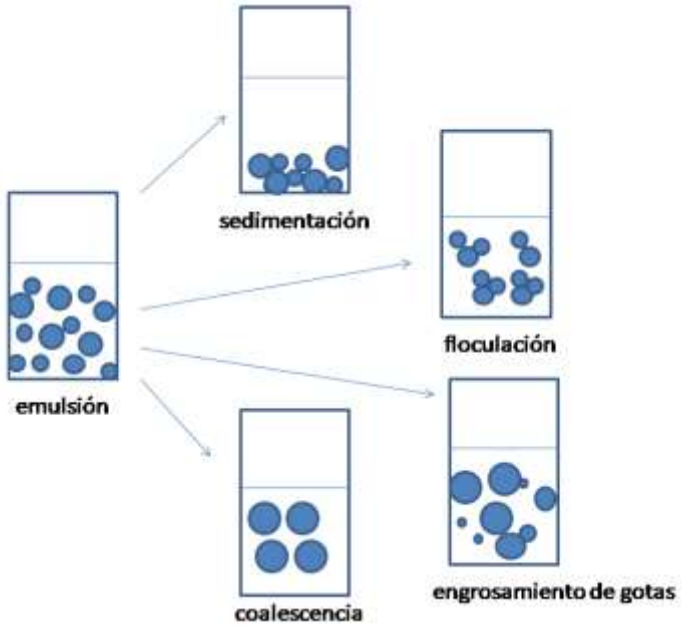


Figura 1.1. Procesos relacionados con la inestabilidad de las emulsiones.

Para resolver este problema, se recurre al uso de ciertas sustancias químicas denominadas surfactantes las cuales permiten estabilizar cinéticamente las emulsiones disminuyendo el tamaño de gota y por ende la tensión interfacial. De esta manera pueden obtenerse dos tipos de sistemas de gran aplicación en el desarrollo de PFCP: las *nanoemulsiones* y las *microemulsiones*.

1.2.1 Nanoemulsiones

Son sistemas bifásicos, es decir, emulsiones cuyo tamaño de gota es inferior a 100 nm. Están compuestas por una fase acuosa, una fase oleosa y al menos un surfactante. Son sistemas transparentes que requieren del aporte de energía para formarse[13]. Los métodos utilizados con mayor frecuencia para preparar nanoemulsiones incluyen la homogeneización a alta presión, la microfluidización y la inversión de fase por temperatura. Las nanoemulsiones suelen ser susceptibles a la formación de crema, floculación y otros problemas de inestabilidad física asociados con las emulsiones. A pesar de esto, pueden ser estables (metaestables) durante largos períodos, debido al

[13] Ahmed, K., Li, Y., McClements, D. J., & Xiao, H. (2012). Nanoemulsion-and emulsion-based delivery systems for curcumin: Encapsulation and release properties. *Food chemistry*, *132*(2), 799-807.

tamaño extremadamente pequeño de sus gotas, si se usan surfactantes adecuados[14]. Como se ha comentado, estos sistemas son de gran interés como sistemas portadores de moléculas activas como antiinflamatorios[15,16], antitumorales[17,18], biocidas[19,20], antimicrobianos[21,22], entre otros, de gran importancia en el campo farmacéutico y cosmético. Munir y col.[15] utilizaron nanoemulsiones como plataformas para desarrollar un gel tópico con 2% de dexibuprofeno que demostró ser eficaz para el tratamiento de afecciones inflamatorias. En el mismo sentido, Hsieh y col.[16] desarrollaron nanoemulsiones cargadas con glutatión y quercetina. Los sistemas obtenidos demostraron una reducción significativa del eritema cutáneo, la descamación y el engrosamiento epidérmico. Por otro lado, Eltahan y col.[17] obtuvieron nanoemulsiones para la administración de dasatinib, un fármaco utilizado para el tratamiento del cáncer de mama. Los estudios demostraron óptimos resultados de disolución del fármaco, permeación intestinal y eficacia *in-vivo*. A su vez, Hussein y col.[18] investigaron el potencial anticancerígeno del extracto de *Spirulina maxima*, incorporándose a una nanoemulsión.

[14] Simonazzi, A., Cid, A. G., Villegas, M., Romero, A. I., Palma, S. D., & Bermúdez, J. M. (2018). Nanotechnology applications in drug controlled release. In *Drug targeting and stimuli sensitive drug delivery systems* (pp. 81-116). William Andrew Publishing.

[15] Munir, R., Khan, I. U., Kamal, Y., Asghar, S., Irfan, M., Alshammari, A., ... & Khalid, S. H. (2025). Dexibuprofen loaded into nanoemulsion based gel for topical application–In vitro characterization and in vivo anti-inflammatory evaluation. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 247, 114407.

[16] Hsieh, I. T., Liao, C. C., Chen, J. H., Yang, C. C., Chou, T. H., Nagarajan, D., ... & Chang, J. S. (2025). Enhanced stability, antioxidant capacity and in vivo anti-inflammatory efficacy of glutathione and quercetin via nanoemulsion formulation. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 168, 105943.

[17] Eltahan, D. A., Eid, R. K., Ashmawy, S. M., & El Maghraby, G. M. (2025). Nanoemulsion for enhanced absorption and anti-tumor activity of dasatinib. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 106870.

[18] Hussein, M. Y., Nasr, M., Emad, V., Maged, J., George, P., Emad, A., ... & Hussein, J. (2025). Unveiling the potential anticancer activity of Spirulina maxima extract-nanoemulsion through in vitro and in vivo studies. *Scientific Reports*, 15(1), 912.

[19] Elghonemy, M. M., Ayoob, F., Abdel-Ghany, H. S., Kassem, A. M., El-Gendy, A. E. N. G., Abdel-Shafy, S., ... & Elshamy, A. I. (2025). Larvicidal Effects of Cymbopogon commutatus Essential Oil and Its Based Nanoformulations on Culex pipiens: Chemical Profiling and Physicochemical Characterization. *Chemistry & Biodiversity*, e202403276.

[20] Ngadni, M. A., Chong, S. L., Awang, K., Azirun, M. S., Omar, D., Ishak, I. H., & Asib, N. (2025). Larvicidal Activity of Chisocheton erythrocarpus Nano-emulsion Formulation against Aedes aegypti. *Journal of Oleo Science*, 74(4), 385-395.

[21] Paliwal, H., & Prajapati, B. G. (2025). Development and In Vitro Characterization of a Voriconazole Loaded Nanoemulsion for Potential Intranasal Drug Delivery. *BioNanoScience*, 15(2), 263.

[22] Salahi, E., Asgharzadeh, A., & Tatari, M. (2025). Fungicidal Activity of Artemisia sieberi Essential Oil and Nanoemulsion Against Penicillium on Oranges: Phytochemical Properties. *Egyptian Journal of Chemistry*.

El estudio concluye que la nanoemulsión mejora la administración del extracto de *S. maxima* y se muestra prometedor como un tratamiento eficaz contra el cáncer.

En otro sentido, Elghonemy y col.[19] desarrollaron nanoemulsiones utilizando aceite esencial de *Cymbopogon commutatus*. Las nanoformulaciones mostraron actividad larvicida frente al mosquito *Culex pipiens*. En la misma línea, Ngadni y col[20]. propusieron mejorar la actividad larvicida del extracto crudo de *Chisocheton erythrocarpus* contra larvas del mosquito *Aedes aegypti* mediante la formulación de nanoemulsiones. Los sistemas desarrollados demostraron una significativa actividad larvicida y una mejor penetración cuticular del ingrediente activo. Por último, Paliwal y col[21]. desarrollaron una nanoemulsión cargada con voriconazol, un antifúngico de amplio espectro, destinada a su administración por vía intranasal. Los resultados indicaron una liberación eficiente del fármaco desde la formulación, sin efectos citotóxicos detectables sobre las células epiteliales nasales. Estos hallazgos respaldan el potencial de la nanoemulsión como una alternativa terapéutica no invasiva y eficaz frente a las infecciones fúngicas, con ventajas significativas respecto a las vías oral e intravenosa convencionales. A su vez, Salahi y col.[22] evaluaron los efectos antimicrobianos de una nanoemulsión elaborada con el aceite esencial de *Artemisia sieberi*. Las pruebas realizadas revelaron que el aceite esencial puro mostró mejor actividad frente a la bacteria *Escherichia coli*. Sin embargo, la nanoemulsión obtenida demostró una mayor eficacia contra *Staphylococcus aureus* y actividad antifúngica contra *Penicillium digitatum*.

1.2.2 Microemulsiones

Son sistemas coloidales que pueden contener cantidades equivalentes de líquidos inmiscibles, generalmente agua y aceite, debido a la presencia de uno o varios surfactantes y de un co-surfactante (Figura 1.2). La fase dispersa tiene un tamaño de gota en el rango de 10 a 200 nm[23].

Para describir de manera sencilla el proceso de formación de una microemulsión podemos considerar una subdivisión de la fase dispersa en gotas muy pequeñas. Así, el cambio de entropía configuracional (ΔS_{conf}) puede aproximarse a:

[23] Slomkowski S., Aleman J. V., Gilbert R. G., Hess M., Horie K., Jone R. G., Kibisa P., Meisel I., Mormann W., Penczek S., & Stepto R. F. T. (2011) Terminology of polymers and polymerization processes in dispersed systems (IUPAC recommendations 2011), *Pure and Applied Chemistry*, *83*(12) 2229-2259.

$$\Delta S_{conf} = -nK_B + [ln\emptyset + \{(1-\emptyset)/\emptyset\} ln(1-\emptyset)] \qquad \text{Ecuación 1.1}$$

donde *n* es el número de gotas de fase dispersa, K_B es la constante de Boltzmann y $\emptyset$ es la fracción de volumen de fase dispersa.

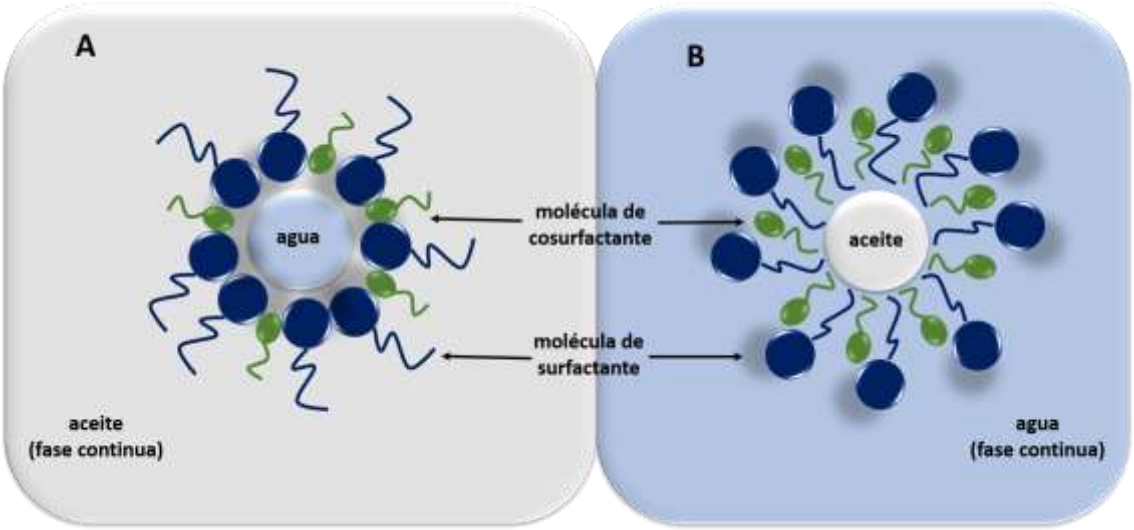


Figura 1.2. A) Representación esquemática de una microemulsión (w/o) donde un aceite es la fase continua. B) Representación esquemática de una microemulsión (o/w) donde el agua es la fase continua.

El cambio de energía libre asociado a este proceso puede ser expresado como la suma de la energía libre para crear un área de interfase ($\Delta A\gamma_{12}$) y la entropía configuracional (ΔS_{conf}):

$$\Delta G_{form} = \Delta A_{\gamma 12} - T\Delta S_{conf} \qquad \text{Ecuación 1.2}$$

donde ΔA es el cambio en el área interfacial A (igual a $4\pi r^2$ por gota de radio r) y γ_{12} es la tensión interfacial entre las fases 1 y 2 (por ejemplo, aceite y agua) a una temperatura T. Reemplazando la Ecuación 1.1 en la Ecuación 1.2 se obtiene la expresión correspondiente a la máxima tensión interfacial entre las fases 1 y 2. En una dispersión, el número de gotas se incrementa y el ΔS_{conf} es positivo. Si un surfactante puede reducir la tensión interfacial a un valor lo suficientemente bajo, el término $\Delta A\gamma_{12}$ en la ecuación 1.2 será relativamente pequeño y positivo, permitiendo así un cambio de energía libre de signo negativo y por lo tanto favorable, dando como resultado la formación de un sistema microemulsionado.

En un sistema aceite-agua (o/w) libre de surfactantes, $\gamma_{o/w}$ está en el orden de 50 mN m^{-1} y durante la formación de la microemulsión el incremento de ΔA es muy grande

(10^4 a 10^5). Por ello, en ausencia de surfactante, el segundo término en la ecuación 1.3 es del orden de $1000K_BT$, y por ello, para cumplir con la condición $\Delta A\gamma_{12} \leq T\Delta S_{conf}$, la tensión interfacial debe ser muy baja (aproximadamente 0,01 mN m^{-1}). Algunos surfactantes, como por ejemplo los iónicos de doble cadena y algunos no-iónicos, pueden reducir significativamente la tensión interfacial (10^{-2} a 10^{-4} mNm^{-1}). Sin embargo, en la mayoría de los casos, esto no es posible a partir del solo agregado de surfactante ya que puede alcanzarse la concentración micelar crítica antes de lograr un valor bajo de $\gamma_{o/w}$. Por ello, una manera efectiva de disminuir $\gamma_{o/w}$ es incluir una segunda especie activa, la cual puede ser otro surfactante o bien un alcohol de cadena media, denominada *co-surfactante*. Este hecho puede explicarse fisicoquímicamente por medio de la ecuación de Gibbs extendida para sistemas de multicomponentes. Esta ecuación relaciona la tensión interfacial con la composición de la capa de surfactante y el potencial químico (μ) de cada componente en el sistema (Ecuación 1.3).

$$d\gamma_{o/w} = -\sum_i(\Gamma_i d\mu_i) \approx \Gamma_i RTdlnC_i \qquad \text{Ecuación 1.3}$$

donde C*i* es la concentración molar del componente *i* en la mezcla, y Γ*i* representa el exceso de superficie (mol m^{-2}). Asumiendo que tanto el surfactante como el co-surfactante son los únicos componentes presentes en la interfase (es decir, Γ*w*= Γ*o* = 0) la ecuación 1.4 queda:

$$d\gamma_{o/w} = -\Gamma_s RTdlnC_s - \Gamma_{Co} RTdln \qquad \text{Ecuación 1.4}$$

Integrando la ecuación 1.4 se obtiene:

$$\gamma_{o/w} = \gamma^0_{o/w} - \int_0^{Cs} \Gamma_s RTdlnC_s - \int_0^{Cco} \Gamma_{Co} RTdlnC_{Co} \qquad \text{Ecuación 1.5}$$

Así podemos ver que $\gamma^0_{o/w}$ puede disminuirse por dos términos, uno correspondiente al surfactante y otro al co-surfactante, siendo sus efectos aditivos. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que las dos especies deben ser incorporadas simultáneamente, y no deben interaccionar entre ellas, es decir, deben ser de diferente naturaleza química, de lo contrario el proceso de formación de la microemulsión no ocurrirá. La Figura 1.3 muestra la disminución del área interfacial de un sistema disperso por el agregado de un co-surfactante.

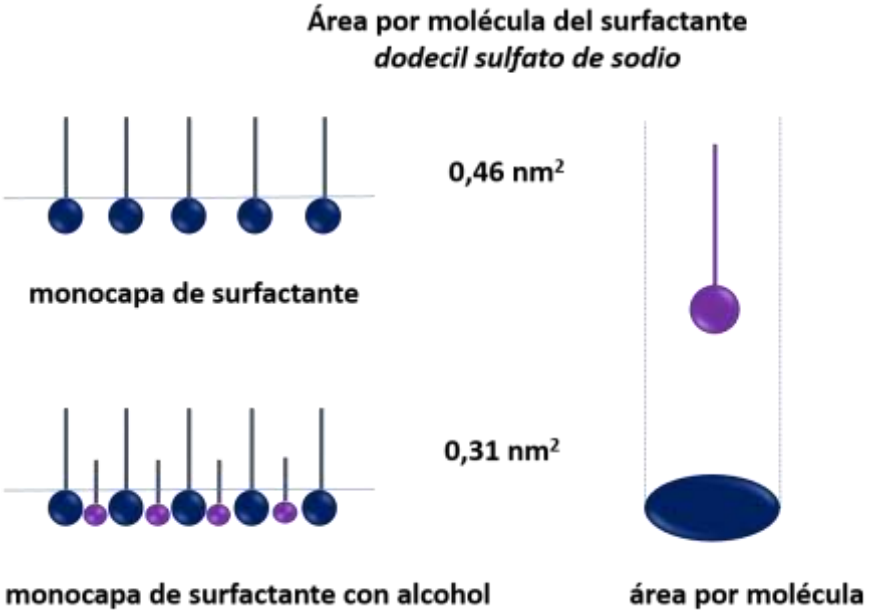


Figura 1.3. Representación esquemática de la disminución del área interfacial de un sistema disperso por efecto del agregado de un co-surfactante.

Las microemulsiones no se ajustan a un solo modelo estructural. Dependiendo de la composición relativa de agua, aceite y surfactante, pueden adoptar diferentes organizaciones internas. Una de las configuraciones es la microemulsión de tipo aceite en agua (o/w), en la cual pequeñas gotas de fase oleosa se encuentran dispersas en una fase continua acuosa, estabilizadas por surfactantes cuya parte hidrófoba se orienta hacia el interior de las gotas. En cambio, las microemulsiones de tipo inverso (w/o) presentan una disposición opuesta ya que las microgotas de agua están dispersas en una fase continua oleosa, con el surfactante organizado de manera que su cabeza polar rodea a las gotas de agua. Entre estas dos estructuras extremas, también pueden formarse sistemas *bicontinuos*, en los cuales las fases acuosa y oleosa forman redes interpenetradas separadas por una película de surfactante, generando una estructura continua y homogénea con ambas fases. Por otro lado, la transición entre los diferentes tipos de microemulsiones puede lograrse variando la proporción de agua/aceite, la concentración de surfactante o las condiciones de temperatura. En la Figura 1.4 puede observarse un esquema de las posibles estructuras que pueden adoptar las microemulsiones, ya sean aceite en agua (o/w), bicontinuas y agua en aceite (w/o).

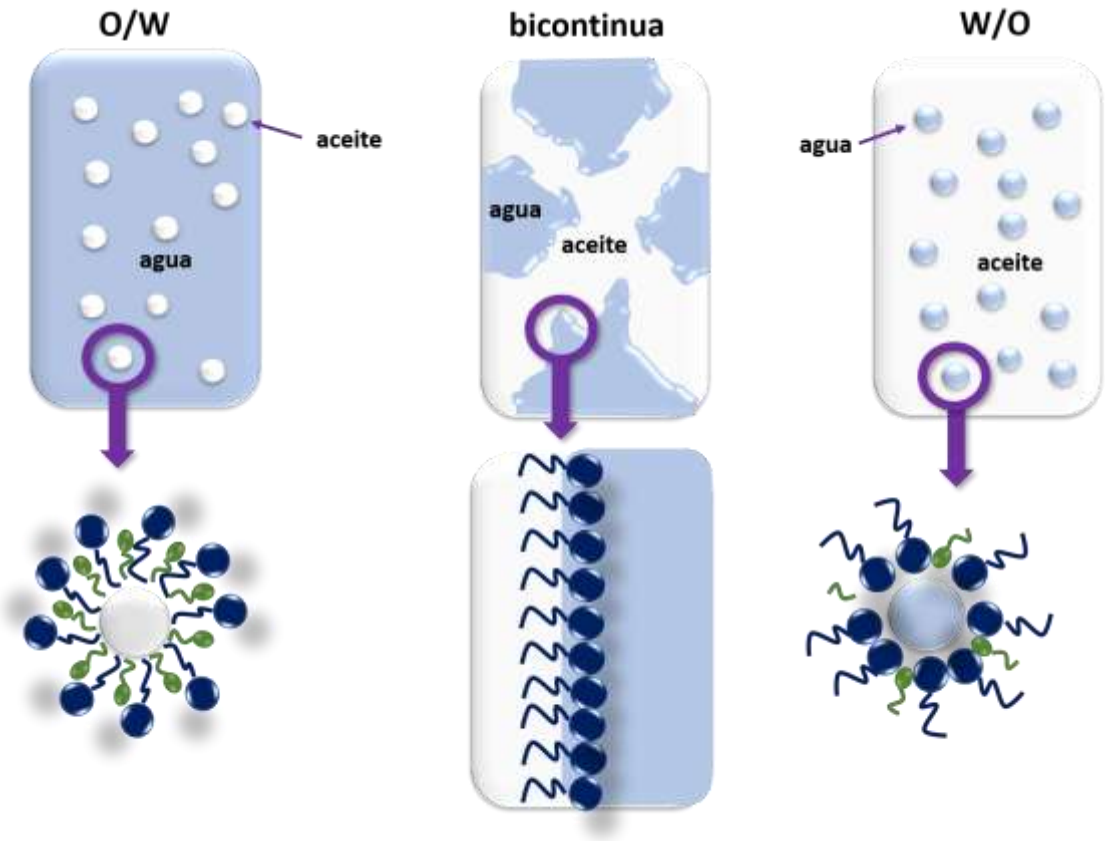


Figura 1.4. Estructura de los distintos tipos de microemulsiones: aceite en agua (o/w), bicontinua y agua en aceite (w/o). En celeste se representa la fase acuosa en cada caso.

En la Tabla 1.1 se describen las principales características de las microemulsiones y sus diferencias con las emulsiones y las nanoemulsiones.

Tabla 1.1. Principales diferencias entre sistemas dispersos del tipo de las emulsiones, nanoemulsiones y microemulsiones.

	Tipo	**Tamaño de gota (nm)**	**Requiere Energía**	**Estabilidad**
Emulsión	o/w w/o	200 – 1000	SI	Cinética
Nanoemulsión	o/w w/o	< 100	SI	Cinética
Microemulsión	o/w bicontinua w/o	10-200	NO	Termodinámica

A continuación, se describen más en detalle los principales aspectos y características de los componentes que conforman las microemulsiones.

1.2.2.1 Surfactantes

Estos compuestos, también denominados tensioactivos, contribuyen a la formación de este tipo de sistemas dispersos ya que poseen en su estructura molecular dos dominios marcados: un dominio hidrofílico y un dominio hidrofóbico, por lo que suele referirse a una doble afinidad[24]. La parte polar o hidrófila es soluble en agua y solventes polares, y generalmente está compuesta por átomos como O, P, S o N que pueden encontrarse en grupos alcoholes, ácido, carboxilo, aminas, sulfonatos, entre otros. Por otro lado, la parte apolar o hidrófoba es soluble en aceites y solventes no polares. Esta parte de la estructura del surfactante puede ser una cadena hidrocarbonada lineal o ramificada, generalmente de tipo alquilo o alquilbenceno, y en ciertos casos puede llegar a contener átomos de algún halógeno u oxígeno. Así, estos compuestos pueden orientarse de manera espontánea en la interfase formando una película interfacial que puede modificar las interacciones a este nivel proporcionando actividad. En la Figura 1.5 se observa la estructura básica de un surfactante con su respectiva orientación en el medio donde se encuentra.

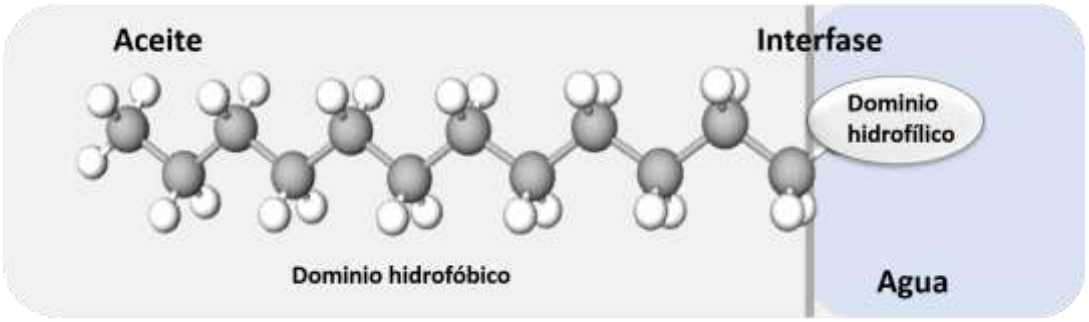


Figura 1.5. Esquema de la estructura básica de un surfactante.

A continuación, se describen los principales tipos de surfactantes adecuados para la obtención de microemulsiones.

[24] Sakamoto K., Lochhead R. Y., Maibach H. I., Yamashita Y. (2017) En *Cosmetic Science and Technology: Theoretical principles and Applications*, Capítulo 15, 231-244. Elsevier.

Surfactantes catiónicos. En este tipo de surfactante, los grupos funcionales de la porción hidrófila se ionizan en medio acuoso generando iones con carga positiva, quienes son los responsables de la actividad superficial. Como contraparte, se genera un anión, habitualmente de tipo halogenuro[25]. La mayoría de los surfactantes catiónicos son compuestos nitrogenados, como por ejemplo sales de amonio o sales de amonio cuaternario. La estructura general de estos agregados se observa en la Figura 1.6A. Dentro de las ventajas que podemos mencionar al utilizar este tipo de compuestos se encuentran sus propiedades suavizantes, bactericidas y la facilidad de absorción en superficies biológicas o inertes con carga negativa. Sin embargo, los surfactantes catiónicos poseen una biodegradabilidad baja y, en general, son incompatibles con los surfactantes aniónicos. En particular, un uso tópico habitual de este tipo de surfactantes es en cosmética para la elaboración de acondicionadores para el cabello.

Surfactantes aniónicos. En solución acuosa, estos compuestos se ionizan generando iones de carga negativa (Figura 1.6B). Poseen una cadena alquílica hidrocarbonada que puede ser lineal o ramificada, encontrándose en el extremo polar de la molécula el anión[26]. De forma general, podemos clasificarlos en sulfatos y sulfonatos, fosfatos y fosfonatos, y carboxilatos. Los sulfonatos y sulfatos de cadena larga son habitualmente utilizados como detergentes y jabones (derivados de ácidos grasos carboxílicos de cadena larga). Ejemplo de este tipo de compuestos son el lauril sulfato de sodio y el estearato sódico. Si bien presentan la ventaja de poseer elevada biodegradabilidad, excelente capacidad limpiadora y bajo costo de fabricación, los surfactantes aniónicos son los más agresivos para la piel y el cabello, de hecho, alteran la barrera cutánea y pueden resultar irritantes.

Surfactantes anfóteros. Como su nombre lo indica, estos surfactantes tienen diferente carga según el medio en que se encuentren variando la misma según el pH de la solución en la que se utilicen. Es decir, poseen en su estructura tanto una carga negativa

[25] Gonçalves, R. A., Holmberg, K., & Lindman, B. (2023). Cationic surfactants: A review. *Journal of Molecular Liquids*, *375*, 121335.
[26] van Os, N. M., Haak, J. R., & Rupert, L. A. M. (2012). Physico-chemical properties of selected anionic, cationic and nonionic surfactants. Elsevier.

como una carga positiva. En un medio cuyo pH se encuentre cerca del punto isoeléctrico de estos surfactantes la actividad superficial será mínima. Sin embargo, si las condiciones del medio varían, estos compuestos podrán actuar como catiónicos a pH ácido o como aniónicos a pH alcalino. La dualidad de carga que exhiben estos compuestos se debe a que poseen ciertos grupos funcionales capaces de ionizarse en disolución acuosa, generalmente grupos catiónicos de tipo amina o amonio y estructuras típicas como las betaínas o los aminoácidos, que se comportan como catiónicos en solución ácida y como aniónicos en medio básico. La estructura general de los surfactantes anfóteros se observa en la Figura 1.6C. Las propiedades que presentan los surfactantes anfóteros hacen que su utilización en la preparación de formulaciones ofrezca las ventajas de que sean compatibles con los demás surfactantes (catiónicos, aniónicos y no-iónicos) además de producir muy baja irritación al ponerse en contacto con la piel o los ojos. Por todo esto, los surfactantes anfóteros son empleados en artículos de higiene personal como lo son los champuses. Como ejemplo de este tipo de surfactantes podemos citar cetil betaína, lauroanfoacetato de sodio y cocoanfoacetato de sodio, entre otros[27,28].

Surfactantes no-iónicos. Estos surfactantes no se ven afectados por el pH del medio donde se encuentran ya que su porción hidrófila no puede disociarse y por lo tanto en solución acuosa no poseen carga eléctrica. La estructura básica de estos compuestos se muestra en la Figura 1.6D. Los mismos poseen grupos funcionales tipo alcohol, fenol, éter o amida, que los hace solubles en agua, mientras que la parte hidrófoba generalmente está compuesta por grupos alquilo o alquil benceno y en ocasiones por estructuras de origen natural como lo son los ácidos grasos. Estos compuestos son compatibles con todos los surfactantes, poseen muy buena capacidad humectante y prácticamente no alteran la función barrera de la piel, es por esto que son muy utilizados en formulaciones tópicas. Algunos de estos surfactantes son sintetizados a partir de la condensación del óxido de etileno con materiales fenólicos o grasos o los alquilpoliglucósidos. Dentro de este grupo de compuestos se encuentran los polisorbatos. En particular, el polisorbato 80 es un compuesto derivado de la etoxilación del sorbitano y posteriormente monoesterificado

[27] Clendennen, S. K., & Boaz, N. W. (2019). Betaine amphoteric surfactants—Synthesis, properties, and applications. En *Biobased surfactants* (pp. 447-469). AOCS Press.
[28] Gadberry, J. F., & Otterson, R. (2006). Other types of surfactants. En *Chemistry and Technology of Surfactants*, *153*.

con ácido oleico. También denominado Tween 80, es uno de los surfactantes no-iónicos más utilizado en formulaciones tópicas ya que posee acción humectante y emoliente. Además, no es irritante para la piel y mucosas. Otro ejemplo de surfactante no-iónico es el denominado Cremophor EL, el cual se obtiene por reacción del aceite de ricino hidrogenado con óxido de etileno. Compuesto por glicerilo oxiestearato de polietilenglicol y ésteres de ácidos grasos de poliglicerilo, este surfactante es empleado para formulaciones tópicas que necesiten solubilizar sustancias activas de carácter hidrofóbico. Tween 80 y Cremophor EL han sido utilizados en la obtención de microemulsiones para uso tópico. Butani y col.[29] desarrollaron una microemulsión de aplicación tópica para el tratamiento de infecciones fúngicas invasivas. La formulación estuvo compuesta por 0,1% (p/p) del fármaco antifúngico anfotericina B, 5,0% (p/p) de miristato de isopropilo como fase oleosa y 35,0% (p/p) de una mezcla de Tween 80: propilenglicol (3:1) como surfactante y co-surfactante, respectivamente. Por otro lado, Zhu y col.[30] estudiaron la posible aplicación de microemulsiones como carga de penciclovir para la administración dérmica de fármacos. Para ello, la microemulsión estuvo compuesta por 5,0% (p/p) de ácido oleico como fase oleosa, 20,0% (p/p) de Cremophor EL como surfactante, 30,0% (p/p) de etanol como co-surfactante y 45,0% (p/p) de agua como fase acuosa.

[29] Butani, D., Yewale, C., & Misra, A. (2014). Amphotericin B topical microemulsion: formulation, characterization and evaluation. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 116, 351-358.

[30] Zhu, W., Yu, A., Wang, W., Dong, R., Wu, J., & Zhai, G. (2008). Formulation design of microemulsion for dermal delivery of penciclovir. *International Journal of pharmaceutics*, 360(1-2), 184-190.

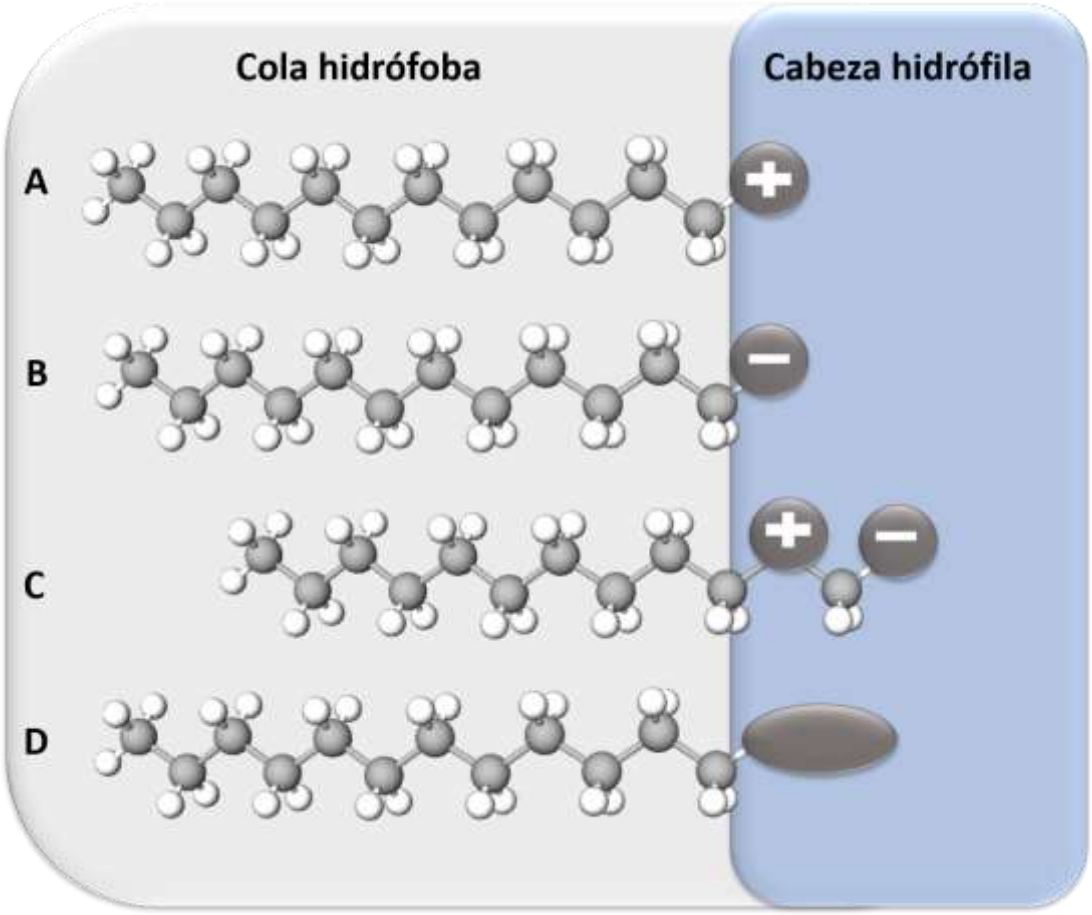


Figura 1.6. Estructura básica de los distintos tipos de surfactantes. A) Surfactante catiónico B) Surfactante aniónico C) Surfactante anfótero D) Surfactante no-iónico

Por otro lado, los surfactantes pueden formar agregados micelares debido a sus características estructurales. Esto implica poseer una cadena hidrocarbonada de ocho o más átomos de carbono de longitud y una polaridad mínima a través de la parte polar de la molécula que conforme su estructura. La relación hidrófila/lipófila de los surfactantes está definida por la escala de balance hidrofílico-lipofílico (HLB, del inglés *hydrophilic-lipophilic balance*) propuesta por Griffin[31]. Esta escala asigna como valores arbitrarios 1 al ácido oleico (compuesto completamente insoluble en agua) y 20 al oleato de sodio (compuesto completamente soluble en agua). El método de Griffin fue desarrollado inicialmente para surfactantes no-iónicos derivados de alcoholes polioxietilenados y ésteres de sorbitano relacionando las masas moleculares de las porciones hidrofílica y total de la molécula utilizando la Ecuación 1.6:

[31] Griffin, W. C. (1949). Classification of surface-active agents by "HLB". *J. Soc. Cosmet. Chem.*, *1*, 311-325.

$$HLB = 20\,x\,(Mh/M)$$ Ecuación 1.6

siendo Mh y M las masas moleculares de la porción hidrofílica y total de la molécula, respectivamente. De esta manera, se asignaron valores de HLB aproximados a diferentes surfactantes basándose en su estructura química y comportamiento observable. La Tabla 1.2 muestra valores de HLB asignados a distintos surfactantes[32].

Tabla 1.2. Valores de HLB de diferentes tipos de surfactantes según Griffin[32].

Nombre comercial	Ácido graso de origen	Unidades de óxido de etileno	HLB
Emcol EO-50	Ácido oleico	1	2,7
Emcol EL-50	Ácido láurico	1	3,6
Atlas G-2139	Ácido oleico	2	4,7
Emcol DO-50	Ácido oleico	2	4,7
Span 60	Ácido esteárico (mono)	4,7	6,8
Span 80	Ácido oleico (mono)	4,3	6,8
Myrj 45	Ácido esteárico	8	11,1
Myrj 51	Ácido esteárico	26	16,0
Tween 20	Lauric acid (mono)	20	16,7
Tween 80	Ácido oleico (mono)	20	16,7

Así, es posible obtener una escala con diferentes valores de HLB donde de manera general se establece que valores de HLB menores a 10 permiten obtener emulsiones de tipo (w/o), mientras que valores de HLB superiores a 10 permiten obtener emulsiones de

[32] Pasquali, R. C., Taurozzi, M. P., & Bregni, C. (2008). Some considerations about the hydrophilic–lipophilic balance system. *International journal of pharmaceutics*, 356(1-2), 44-51.

tipo (o/w). La Tabla 1.3 muestra el rango de valores de HLB adecuado para las distintas aplicaciones que pueden tener los surfactantes[33].

Tabla 1.3. Aplicaciones de los surfactantes según su rango de HLB.

HLB	Aplicaciones
3-6	Emulsiones (w/o)
7-9	Agentes humectantes
8-18	Emulsiones (o/w)
13-16	Detergentes
15-18	Solubilizantes

El método de Griffin es ampliamente utilizado para surfactantes comerciales de estructura conocida, especialmente aquellos no-iónicos. Sin embargo, para calcular el HLB de surfactantes más complejos, incluyendo iónicos, no iónicos y anfóteros, se suele utilizar el método de Davies[34], basado en la suma de contribuciones de grupos funcionales, utilizando valores asignados experimentalmente para cada tipo de grupo, según la Ecuación 1.7:

$$HLB = 7+\sum(H\cdot nH) - \sum(L\cdot nL) \qquad \text{Ecuación 1.7}$$

siendo *n* el número de grupos hidrofílicos (H) y lipofílicos (L) de la molécula, respectivamente. Por lo tanto, los parámetros H y L están relacionados con el efecto hidrofílico/lipofílico de distintos grupos, atribuyendo valores de contribución positivos para grupos hidrofílicos y negativos para grupos lipofílicos, como se muestra en la Tabla 1.4[35]. El valor 7 representa el punto de equilibrio entre características hidrofílicas y lipofílicas.

[33] Egito, E. S. T., Machado, L. A., Farias, I. E., Silva, K. G. H., & Oliveira, A. G. (2018). HLB Concept: a way to never forget it. *Biomedical Journal*, 1, 2.
[34] Davies, J. T. (1957). A quantitative kinetic theory of emulsion type, I. Physical chemistry of the emulsifying agent. In Gas/Liquid and Liquid/Liquid Interface. Proceedings of the International Congress of Surface Activity (Vol. 1, pp. 426-438). Citeseer.
[35] Guo, X., Rong, Z., & Ying, X. (2006). Calculation of hydrophile–lipophile balance for polyethoxylated surfactants by group contribution method. *Journal of Colloid and Interface Science*, 298(1), 441-450.

Tabla 1.4. Valores de contribución para grupos funcionales presentes en la estructura de surfactantes y utilizados para el cálculo del HLB.

Grupo funcional	Valor de contribución
-CH3 (metilo)	-0,475
-CH2- (grupo metileno)	-0,475
-OH (hidroxilo)	+1,9
-COO- (carboxilato)	+2,1
-O- (éter)	+1,3
=O (carbonilo)	+1,0

1.2.2.2 Co-surfactantes

En el proceso de obtención de una microemulsión es habitual utilizar compuestos anfifílicos también denominados co-surfactantes. Estos compuestos se solubilizan tanto en medio acuoso como en un solvente no polar. Es importante destacar que todos los surfactantes se pueden considerar anfifilos pero esta afirmación no ocurre a la inversa ya que, a diferencia de los surfactantes, los anfifilos no exhiben actividad superficial. Dentro de este grupo de compuestos se encuentran los alcoholes, siendo habitualmente utilizados aquellos que poseen cadena hidrocarbonada mediana o corta. Como se mencionó anteriormente, la función principal de estos compuestos implica reducir la tensión interfacial del sistema. Además, las propiedades reológicas de estos compuestos y la relación grupo polar/cadena hidrocarbonada, les permite actuar sobre la curvatura de la interfase. Por otro lado, los co-surfactantes pueden mejorar la fluidez de la película interfacial ya que ayudan a la función estabilizadora de los surfactantes, particularmente en el caso de los surfactantes no-iónicos[36]. Dentro de este grupo de compuestos podemos

[36] Bayrak, Y. (2004). Interfacial composition and formation of w/o microemulsion with different amphiphiles and oils. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 247, 99-103.

mencionar alcoholes como etanol, n-butanol y n-pentanol, entre otros[37,38]. Klossek y col.[39] demostraron que la incorporación de un co-surfactante, en particular, el etanol, en combinación con citronelol, permitió reducir eficazmente la tensión interfacial en sistemas microemulsionados, lo que favoreció la expansión del dominio monofásico incluso hacia formulaciones altamente diluibles en agua. Para ello, utilizaron mezclas de agua, oleato de sodio como surfactante, citronelol como co-surfactante y limoneno como fase oleosa y observaron que la sustitución progresiva de citronelol por etanol facilitó la transición entre diferentes estructuras de microemulsión (tipo w/o, bicontinuas y o/w), dependiendo de la proporción etanol/aceite. En particular, a concentraciones elevadas de etanol (≥92,5 %) y con una relación total surfactante + cosurfactante/aceite ≥ 4:1, obtuvieron una microemulsión capaz de incorporar hasta un 99 % de agua, evidenciando la eficacia del co-surfactante en la modulación estructural del sistema.

1.2.2.3 Fase oleosa

Como se ha mencionado previamente, la obtención de microemulsiones requiere la inclusión de una fase oleosa, cuya selección depende de la solubilidad del principio activo en el aceite, su perfil toxicológico y el tipo de aplicación prevista. En el caso de la administración tópica, es fundamental que los componentes sean biocompatibles y seguros[40]. De hecho, en formulaciones cosméticas, esta fase suele estar constituida por aceites vegetales, minerales o esenciales.

Aceites vegetales. Son usualmente empleados en formulaciones tópicas debido a su capacidad para actuar como emolientes, solubilizar compuestos activos y facilitar el

[37] Klossek, M. L., Marcus, J., Touraud, D., & Kunz, W. (2013). The extension of microemulsion regions by combining ethanol with other cosurfactants. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 427, 95-100.
[38] Sripriya, R., Raja, K. M., Santhosh, G., Chandrasekaran, M., & Noel, M. (2007). The effect of structure of oil phase, surfactant and co-surfactant on the physicochemical and electrochemical properties of bicontinuous microemulsion. *Journal of colloid and interface science*, *314*(2), 712-717.
[39] Klossek, M. L., Marcus, J., Touraud, D., & Kunz, W. (2014). Highly water dilutable green microemulsions. *Colloids and surfaces A: Physicochemical and engineering aspects*, 442, 105-110.
[40] Gupta, S., & Moulik, S. P. (2008). Biocompatible microemulsions and their prospective uses in drug delivery. *Journal of pharmaceutical sciences*, *97*(1), 22-45.

transporte de los mismos a través de la barrera lipídica de la piel[41]. Los triglicéridos, compuestos por ácidos grasos y glicerol, son constituyentes principales de los aceites vegetales y desempeñan un papel clave en la estructura, función y regeneración de las membranas celulares que conforman la barrera lipídica de la piel[42]. Por ello, a la hora de elaborar un producto cosmético, resulta recomendable seleccionar compuestos que estén presentes de forma natural en la piel o compuestos químicos sintéticos que presentan una alta biocompatibilidad y similitud estructural con los lípidos cutáneos, tanto en su tipo como en sus proporciones fisiológicas. Un ejemplo de ello es el miristato de isopropilo, un éster lipófilo que, aunque sintético, comparte características con componentes naturales de la barrera lipídica[43]. En la Figura 1.7 se informa la composición de ácidos grasos de la capa epidérmica de la piel en condiciones normales, observándose una mayor composición en ácidos linoleico, oleico y palmítico, respectivamente[44]. Podlogar y col.[45] diseñaron microemulsiones para uso farmacéutico a partir de agua y miristato de isopropilo en distintas proporciones, manteniendo fija la relación de los surfactantes utilizados, Tween 40 e Imwitor 308 (1:1). Los sistemas compuestos por hasta 20% (p/p) de agua resultaron microemulsiones (w/o). Sin embargo, las microemulsiones con aproximadamente entre el 20 % y el 50 % (p/p) de agua resultaron ser de tipo bicontinuas.

Por otro lado, Virani y col.[46] desarrollaron microemulsiones como posibles sistemas de administración transdérmica de risperidona, un fármaco antipsicótico. La microemulsión óptima fue preparada con ácido oleico como fase oleosa (15%), Tween 80 (15%) como surfactante, alcohol isopropílico (20%) como co-surfactante y agua (50%). La misma demostró la capacidad de aumentar de manera considerable la

[41] Sarkar, R., Podder, I., Gokhale, N., Jagadeesan, S., & Garg, V. K. (2017). Use of vegetable oils in dermatology: an overview. *International journal of dermatology*, *56*(11), 1080-1086.
[42] Tada, H., Takamura, M., & Kawashiri, M. A. (2020). Genomics of hypertriglyceridemia. *Advances in Clinical Chemistry*, 97, 141-169.
[43] Ogorzałek, M., Klimaszewska, E., Mirowski, M., Kulawik-Pióro, A., & Tomasiuk, R. (2024). Natural or synthetic emollients? Physicochemical properties of body oils in relation to selected parameters of epidermal barrier function. *Applied Sciences*, 14(7), 2783.
[44] Kunik, O., Saribekova, D., Lazzara, G., & Cavallaro, G. (2022). Emulsions based on fatty acid from vegetable oils for cosmetics. *Industrial Crops and Products*, 189, 115776.
[45] Podlogar, F., Gašperlin, M., Tomšič, M., Jamnik, A., & Rogač, M. B. (2004). Structural characterisation of water–Tween 40®/Imwitor 308®–isopropyl myristate microemulsions using different experimental methods. *International Journal of Pharmaceutics*, 276(1-2), 115-128.
[46] Virani, A., Dholaria, N., Matharoo, N., & Michniak-Kohn, B. (2023). A study of microemulsion systems for transdermal delivery of risperidone using penetration enhancers. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 112(12), 3109-3119.

permeabilidad de la risperidona en comparación con la formulación control (risperidona en propilenglicol).

Cabe destacar que el miristato de isopropilo y el ácido oleico son los componentes más frecuentemente seleccionados como fase oleosa a la hora de obtener microemulsiones[47]

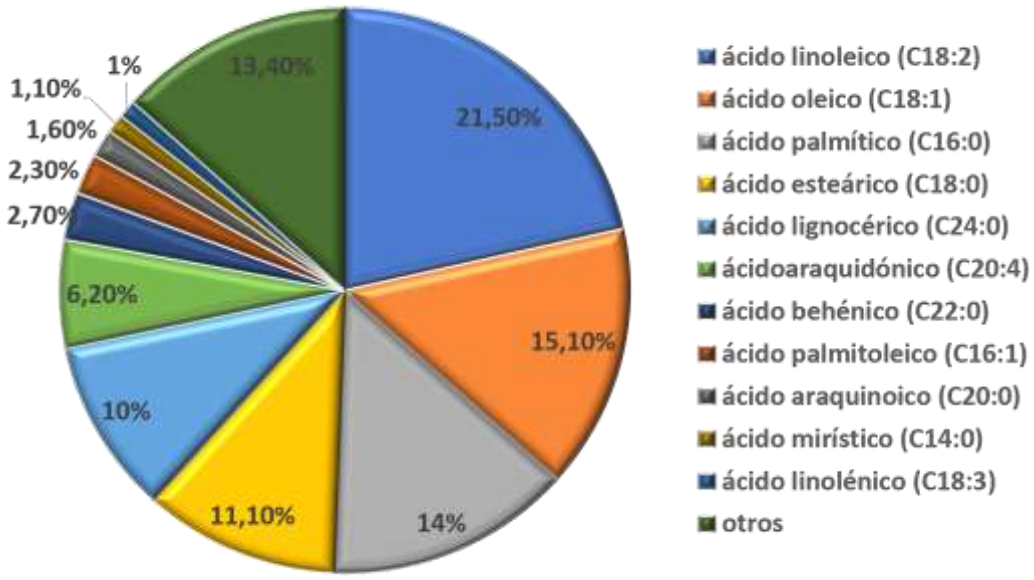


Figura 1.7. Porcentaje promedio de ácidos grasos en la epidermis de la piel humana en condiciones normales. Entre paréntesis se especifica el número de carbonos y enlaces insaturados, respectivamente.

Aceites minerales. Los aceites minerales y las ceras son ingredientes que habitualmente se pueden encontrar en productos cosméticos, tales como lociones, cremas, limpiadores y bálsamos labiales. Esto se debe a su alta compatibilidad con la piel, sus propiedades emolientes, así como su eficacia para actuar como agentes limpiadores[48]. Desde el punto de vista químico, estos compuestos son mezclas de hidrocarburos mayormente saturados, que pueden presentar estructuras lineales, ramificadas o cíclicas, generalmente con más de 16 átomos de carbono. La proporción entre estas diferentes configuraciones moleculares define las características específicas de cada aceite mineral

[47] Lopes, L. B. (2014). Overcoming the cutaneous barrier with microemulsions. *Pharmaceutics*, 6(1), 52-77.
[48] Bhatnagar, S., & Khurana, S. (2024). Oils and Fats as Raw Materials for Cosmetics. En *Oils and Fats as Raw Materials for Industry*, (Cap. 6, pp. 145-167).

o cera. En la Tabla 1.5 se presentan algunos de los aceites minerales más utilizados en formulaciones cosméticas[49].

Tabla 1.5. Características químicas y propiedades de aceites minerales y ceras utilizados en cosmética.

Compuesto	Longitud de la cadena hidrocarbonada	PM (g mol^{-1})	Log Kow
Parafina líquida	C15-C50	230–700	7,7-24,2
Isoparafina C18-70	C18-C70	500–550	n.d
Parafina	C18-C65	350–550	10,6-12,6
cera sintética	C20-C100+	360–1200	10,6-12,6
Cera microcristalina	C18-C90+	500–800	13,38
Cera microcristalina hidrogenada	C18-C90+	500–800	12,47
Petrolato	C18-C90+	500–800	12,0-13,1
Ozoquerita	C18-C90+	350–800	n.d
Ceresina	C18-C90+	350–800	12,25

Log Kow: coeficiente de partición octanol-agua; n.d: no determinado; PM: peso molecular;

Pakpayat y col.[50] desarrollaron microemulsiones de ácido ascórbico para aplicación tópica. Los componentes de la microemulsión fueron decilglucósido como surfactante y monolaurato de sorbitán como co-surfactante, dioctilciclohexano y aceite mineral como fase oleosa y agua como fase acuosa. Los estudios demostraron que la

[49] Petry, T., Bury, D., Fautz, R., Hauser, M., Huber, B., Markowetz, A., ... & Teichert, T. (2017). Review of data on the dermal penetration of mineral oils and waxes used in cosmetic applications. *Toxicology letters*, 280, 70-78.

[50] Pakpayat, N., Nielloud, F., Fortuné, R., Tourne-Peteilh, C., Villarreal, A., Grillo, I., & Bataille, B. (2009). Formulation of ascorbic acid microemulsions with alkyl polyglycosides. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 72(2), 444-452.

microemulsión obtenida resultó adecuada para la carga de ácido ascórbico para su aplicación tópica como agente blanqueador. Por otro lado, Miyahara y col.[51] desarrollaron un microemulsión a partir de nuevas materias primas multifuncionales para uso cosmético utilizando parafina líquida como fase oleosa, polioxietilen oleil éter como surfactante, polioxipropilen dimetiléter como co-surfactante y agua. Así, en base a distintas proporciones de componentes obtuvieron regiones de microemulsión que luego se diluyeron para formar emulsiones ultrafinas para aplicaciones cosméticas y farmacéuticas.

Aceites esenciales. Son compuestos volátiles derivados del metabolismo secundario de las plantas, extraídos a partir de diversas estructuras vegetales como flores, hojas, frutas, cáscaras de cítricos, semillas, raíces, rizomas y corteza. Estos aceites, insolubles en agua, presentan solubilidad en solventes orgánicos como alcoholes, éteres y aceites grasos. Generalmente, son líquidos a temperatura ambiente, con aromas característicos y una densidad inferior a la del agua[52]. Desde el punto de vista químico, los aceites esenciales están formados por una mezcla compleja de compuestos que pertenecen a distintas familias, principalmente terpenos (como mono-, sesqui- y di-terpenos), así como sustancias oxigenadas tales como alcoholes, cetonas, aldehídos, óxidos, ésteres, ácidos y fenoles[53]. Esta diversidad de componentes les confiere una amplia gama de propiedades terapéuticas y biocidas, entre las que se destacan efectos antibacterianos, antifúngicos, y antivirales[54].

Un *biocida* puede definirse como un compuesto químico o producto biológico utilizado para matar, controlar, el crecimiento o repeler un organismo específico[55]. La

[51] Miyahara, R., Watanabe, K., Ohmori, T., & NAKAMA, Y. (2006). Development of Novel Multifunctional Cosmetic Raw Materials and Their Applications. II.† Novel Emulsifying Method with Random Copolymer of Polyoxyethylene/Polyoxypropylene. *Journal of Oleo Science*, *55*(8), 403-411.

[52] Ríos, J. L. (2016). Essential oils: What they are and how the terms are used and defined. En *Essential oils in food preservation, flavor and safety* (pp. 3-10). Academic Press.

[53] Zuzarte, M., & Salgueiro, L. (2015). Essential oils chemistry. *Bioactive essential oils and cancer*, 19-61.

[54] Djilani, A., & Dicko, A. (2012). The therapeutic benefits of essential oils. Nutrition, well-being and health, 7, 155-179.

[55] Ribeiro M., Simões L.C., & Simões M. (2018). Biocides. Encyclopedia of Microbiology (Fourth Edition), Editor(s): Thomas M. Schmidt, Academic Press, Pages 478-490, ISBN 9780128117378.

Tabla 1.6 presenta los principales tipos y compuestos activos presentes en estos aceites y sus potenciales actividades terapéuticas y/o biocidas[56].

Tabla 1.6. Principales tipos de compuestos y activos presentes en aceites esenciales y sus potenciales efectos terapéuticos.

Tipo de compuesto	Acción terapéutica	Activos
Aldehídos	Sedante, antiinflamatorio, antiviral, hipotensor, vasodilatador	Neral, citronelal, cuminal, cinamaldehído, otros
Alcoholes	Estimulante, bactericida, antiviral, analgésico, fungicida	Geraniol, lavandulol, piperitol, pulegol, α-terpineol, linalool, borneol, esclarenol, mentol, timol, viridiflorol, otros
Ésteres	Antiespasmódico, antifúngico	Acetato de bencilo, acetato de linalilo, otros
Óxidos	Expectorante, propiedades antivirales	Cineol, 1,4-cineol, óxido de linalool, otros
Cetonas	Regenerador celular, mucolítico, neurotóxico	Pulegona, mentona, piperitona, tuyona, alcanfor, verbenona, germacrona, otros
Fenoles	Antibacteriano, estimulante del sistema inmune	Chavicol, p-cresol, carvacrol, otros

Thungmungmee y col.[57] evaluaron la actividad antienvejecimiento de 29 especies de *Dendrobium* y desarrollaron una microemulsión tópica basada en el extracto

[56] Abelan, U. S., de Oliveira, A. C., Cacoci, É. S. P., Martins, T. E. A., Giacon, V. M., Velasco, M. V. R., & Lima, C. R. R. D. C. (2022). Potential use of essential oils in cosmetic and dermatological hair products: A review. *Journal of cosmetic dermatology*, 21(4), 1407-1418.
[57] Thungmungmee, S., Sritularak, B., Wisidsri, N., Kanana, N., & Nimmano, N. (2025). Exploring Anti-Aging Potential of Dendrobium Species and Novel Microemulsion Delivery of Dendrobium kentrophyllum Extract for Anti-Aging Effect. *Nanotechnology, Science and Applications*, 157-171.

de *D. kentrophyllum*. La microemulsión obtenida demostró ser estable y redujo eficazmente el estrés oxidativo inducido por radiación UVB.

Por otro lado, se demostró que algunos aceites esenciales producen actividad larvicida. Montefuscoli y col.[58] realizaron un estudio de laboratorio para comparar el efecto biológico de microemulsiones y emulsiones empleando como fases oleosas aceite esencial de geranio y geraniol, sobre larvas del mosquito *Culex pipiens pipiens*. Los sistemas tipo microemulsión basados en ambos compuestos produjeron un aumento notable de la actividad larvicida en comparación con las emulsiones similares, concluyendo que el efecto biológico está relacionado no sólo con la actividad larvicida de los aceites esenciales empleados sino también con el tamaño de la fase dispersa.

1.2.2.4 Obtención de microemulsiones

Las microemulsiones son sistemas isotrópicos y termodinámicamente estables que se forman de manera espontánea por lo que su obtención involucra métodos de baja energía, entre los cuales podemos destacar:

Emulsificación espontánea. Es uno de los procedimientos más utilizados para la obtención de microemulsiones, debido a su simplicidad y bajo requerimiento energético. Este método consiste en la mezcla manual o mediante agitación mecánica de los componentes (fase acuosa, fase oleosa, surfactante y co-surfactante) en proporciones adecuadas, generalmente a temperatura ambiente o ligeramente elevada. La formación espontánea de la microemulsión se debe a la disminución significativa de la tensión interfacial entre las fases inmiscibles, facilitada por la acción del surfactante y el co-surfactante. Estos compuestos reducen la energía de formación de las gotas, permitiendo la dispersión de una fase en otra en forma de gotas nanométricas, sin necesidad de aplicar altas fuerzas mecánicas[59]. El éxito de este método depende fundamentalmente de la correcta selección y combinación de los componentes. Factores como la naturaleza y

[58] Montefuscoli, A. R., Werdin Gonzalez, J. O., Palma, S. D., Ferrero, A. A., & Fernández Band, B. (2014). Design and development of aqueous nanoformulations for mosquito control. *Parasitology research*, *113*, 793-800.

[59] Yang, Y., Marshall-Breton, C., Leser, M. E., Sher, A. A., & McClements, D. J. (2012). Fabrication of ultrafine edible emulsions: Comparison of high-energy and low-energy homogenization methods. *Food hydrocolloids*, *29*(2), 398-406.

concentración del surfactante, la relación surfactante/co-surfactante, y la proporción entre las fases son determinantes para obtener una microemulsión estable. Aunque es un método sencillo, en algunos casos puede ser necesario aplicar agitación moderada o ligeros cambios de temperatura para favorecer el proceso de auto-emulsificación de los componentes[60].

Método de inversión de fase por temperatura. El método de inversión de fase por temperatura (PIT, del inglés *phase inversion temperature*) se fundamenta en la variación del comportamiento de las fases en sistemas formados por agua, aceite y surfactante, como respuesta a los cambios térmicos. En una emulsión de composición constante, el aumento de la temperatura por encima del PIT provoca una inversión de fases, transformando una emulsión de tipo (o/w) en una de tipo (w/o) efecto atribuido a la modificación de la afinidad del surfactante hacia la correspondiente fase. Posteriormente, al enfriar el sistema y mientras se mantiene la agitación, se restablece la afinidad inicial del surfactante, lo que facilita la formación de una emulsión fina caracterizada por un tamaño de gota pequeño[61]. La obtención exitosa de microemulsiones mediante este método no depende únicamente de la proporción entre surfactante, aceite y agua, sino también de la temperatura aplicada, de las características del surfactante y de las propiedades físicoquímicas de las fases acuosa y oleosa, además de la inclusión o no de co-surfactantes en la formulación[62].

1.2.2.5 Diagramas de fases pseudoternario

Este tipo de diagramas resulta útil para interpretar la relación entre el comportamiento de fases de una mezcla y su composición. En ese sentido, las microemulsiones pueden ser sistemas ternarios o cuaternarios, compuestas por una mezcla de aceite, agua y surfactante (sistema ternario) y, si es necesario, un co-surfactante (sistema cuaternario) cuya mezcla puede dar lugar a gotas que forman una dispersión

[60] Anton, N., & Vandamme, T. F. (2009). The universality of low-energy nano-emulsification. *International journal of pharmaceutics*, *377*(1-2), 142-147.
[61] Friberg, S. E., Corkery, R. W., & Blute, I. A. (2011). Phase inversion temperature (PIT) emulsification process. *Journal of chemical & engineering data*, *56*(12), 4282-4290.
[62] Valoppi, F., Frisina, R., & Calligaris, S. (2017). Fabrication of transparent lemon oil loaded microemulsions by phase inversion temperature (PIT) method: effect of oil phase composition and stability after dilution. *Food Biophysics*, *12*, 244-249.

estable, que puede variar desde un aspecto blanco lechoso hasta un sistema translúcido. Esta apariencia está gobernada por el tamaño de las gotas que componen las microemulsiones que como hemos mencionado no superan los 200 nm. Como puede verse en la Figura 1.8 un diagrama de fases es un gráfico que permite establecer una zona donde existe una relación de componentes adecuada para la formación de un determinado sistema coloidal incluyendo las microemulsiones. Por regla general, debe construirse según el tipo de componentes utilizados, y se evalúa el comportamiento de combinaciones de diferentes proporciones de aceite, agua y una mezcla fija de surfactante:co-surfactante, razón por la cual se define a estos diagramas como *pseudoternarios*. Entonces, se inspecciona visualmente cada combinación preparada. Los sistemas en los que se observa turbidez junto con separación de fases se consideran bifásicos. Por otro lado, después de una agitación suave, los sistemas que se presentan como mezclas estables y translúcidas se consideran monofásicos, y se pueden considerar potenciales microemulsiones, cuya confirmación se realiza más tarde mediante la correspondiente caracterización fisicoquímica. De esta manera, cada tipo de sistema coloidal puede quedar representado por un área específica en el diagrama.

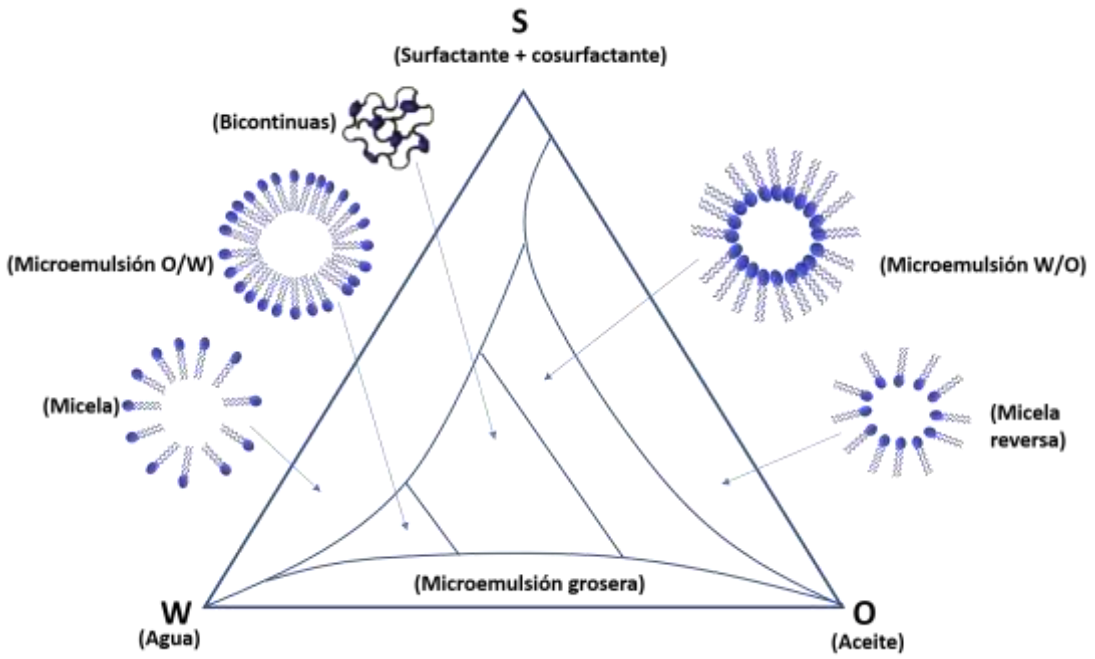


Figura 1.8. Diagrama de fases pseudoternario donde las diferentes regiones representan distintos tipos de sistemas coloidales incluyendo las microemulsiones. Cada eje representa la proporción de cada componente, es decir, fase acuosa, fase oleosa y mezcla surfactante:co-surfactante.

1.2.2.6 Caracterización fisicoquímica de las microemulsiones

La caracterización de microemulsiones comprende un amplio espectro de estudios que permiten corroborar las propiedades fisicoquímicas de los sistemas obtenidos. La información adquirida es de gran importancia para confirmar el tipo de sistema, evaluar el comportamiento de los mismos luego de la carga con los activos de interés y predecir su estabilidad, entre otros. Entre los estudios más relevantes se encuentran el tamaño hidrodinámico de gota, índice de polidispersidad, potencial zeta, pH, índice de refracción y conductividad.

Tamaño hidrodinámico de gota. El tamaño hidrodinámico de gota (Z) hace referencia al diámetro de las partículas o gotas dispersas en el sistema. Como ya se ha mencionado, en el caso de las microemulsiones, dicho tamaño suele encontrarse en el rango de los 10 a 200 nm. Para su determinación, una de las técnicas más utilizadas es la dispersión de luz dinámica (DLS, del inglés *dynamic light scattering*) ya que es no invasiva, resulta de sencilla implementación y permite una rápida adquisición de datos[63]. Sin embargo, DLS no mide el tamaño geométrico o físico de la partícula o gota sino su diámetro hidrodinámico. Este representa el tamaño de una esfera ideal que difunde en el medio con la misma velocidad que la partícula en estudio, incluyendo la capa de solvatación formada por moléculas de solvente o surfactantes asociadas a su superficie[64]. El fundamento de la técnica se basa en la detección de las fluctuaciones de intensidad de la luz dispersada por las partículas en suspensión cuando son iluminadas por un haz láser. Estas fluctuaciones están relacionadas con el movimiento Browniano de las partículas en el medio, es decir, su desplazamiento aleatorio debido a colisiones con las moléculas del solvente. Cuanto más pequeñas son las partículas, más rápido se mueven; y cuanto más grandes, más lentamente se desplazan. Su análisis permite calcular la velocidad de difusión y, mediante la ecuación de Stokes-Einstein (Ecuación 1.8), estimar el tamaño hidrodinámico[65]:

[63] Hassan, P. A., Rana, S., & Verma, G. (2015). Making sense of Brownian motion: colloid characterization by dynamic light scattering. *Langmuir, 31*(1), 3-12.
[64] Babick, F. (2020). Dynamic light scattering (DLS). En *Characterization of nanoparticles* (pp. 137-172). Elsevier.
[65] Cadogan, S. P., Hahn, C. J., Rausch, M. H., & Fröba, A. P. (2017). Study on the applicability of dynamic light scattering (DLS) to microemulsions including supercritical carbon dioxide-swollen micelles. *Journal of Colloid and Interface Science, 499*, 202-208.

$$D = \frac{kBT}{6\pi\eta Rh}$$ Ecuación 1.8

donde D es el coeficiente de difusión traslacional de la partícula (m^2/s); kB es la constante de Boltzmann ($1{,}3806 \times 10^{-23}$ J/K); T es la temperatura absoluta (K); η es la viscosidad dinámica del medio (Pa·s) y Rh corresponde al radio hidrodinámico de la partícula (m).

Índice de polidispersidad. El índice de polidispersidad (PdI, del inglés *polydispersity index*) es un parámetro que describe la distribución de tamaño de las partículas presentes en la muestra. Se expresa como un valor adimensional entre 0 y 1, donde valores cercanos a 0 indican una distribución homogénea o monodispersa, mientras que valores por encima de 0,3-0,5 indican una mayor heterogeneidad en el tamaño de las partículas. La técnica DLS permite determinar este índice a partir del análisis de las fluctuaciones de luz dispersada, proporcionando una estimación rápida de la distribución de tamaños. Un valor de PDI bajo es deseable, ya que sugiere mayor uniformidad y estabilidad en el sistema. Por el contrario, valores de PDI superiores a 0,7 indican que la muestra tiene una distribución de tamaño de gota muy amplia y probablemente no sea adecuada para ser analizada mediante la técnica de DLS[66].

Potencial zeta. El potencial zeta (Pz) representa la diferencia de carga eléctrica entre la capa más externa de partículas en movimiento electroforético y el líquido dispersante que las envuelve, específicamente en lo que se conoce como plano de deslizamiento[67,68]. Cuando se aplica un campo eléctrico a la dispersión coloidal, los iones más cercanos a la superficie de la partícula, que se desplazan junto con ella, se distinguen de aquellos que permanecen inmóviles con el medio dispersante. El límite entre estos dos comportamientos define el plano de cizalladura, y el potencial eléctrico medido en ese

[66] Danaei, M., Dehghankhold, M., Ataei, S., Hasanzadeh Davarani, F., Javanmard, R., Dokhani, A., Khorasani, S., & Mozafari, M. R. (2018). Impact of Particle Size and Polydispersity Index on the Clinical Applications of Lipidic Nanocarrier Systems. *Pharmaceutics*, *10*(2), 57.
[67] Bhattacharjee, S. (2016). DLS and zeta potential–what they are and what they are not? *Journal of controlled release*, *235*, 337-351.
[68] Kaszuba, M., Corbett, J., Watson, F. M., & Jones, A. (2010). High-concentration zeta potential measurements using light-scattering techniques. *Philosophical transactions of the royal society a: mathematical, physical and engineering sciences*, *368*(1927), 4439-4451.

punto recibe el nombre de potencial zeta[69]. Valores de potencial zeta entre -10 mV y +10 mV resultan indicativos de partículas inestables con superficies prácticamente neutras, favoreciendo fenómenos de coagulación. A medida que los valores alcanzan ±15 mV, las fuerzas repulsivas comienzan a predominar, correspondiendo valores superiores a +30 mV o inferiores a -30 mV a sistemas altamente cargados, ya sean catiónicos o aniónicos, los cuales suelen presentar una gran estabilidad[70].

pH. La determinación del pH es especialmente importante cuando las microemulsiones están destinadas a aplicaciones tópicas o farmacológicas, ya que influye directamente en su compatibilidad con la piel y las mucosas. Para minimizar el riesgo de irritación o daño, se recomienda que el pH del sistema se mantenga dentro del rango fisiológico, aproximadamente entre 4,5 y 6,5. Además, el pH juega un rol muy importante en la cinética de liberación de activos y en la cinética de permeación en el tejido blanco.

Conductividad eléctrica. La conductividad eléctrica (CE) proporciona información valiosa sobre la estructura interna de la microemulsión, en particular sobre la naturaleza de la fase continua. Así, las microemulsiones del tipo (o/w) tienden a presentar altos valores de conductividad, mientras que aquellas del tipo (w/o) exhiben conductividades mucho menores, lo cual permite identificar el tipo de sistema formado.

Índice de refracción. El índice de refracción (IR) es un parámetro que permite evaluar isotropía del sistema y puede ser indicativo del tipo de microemulsión presente. Las microemulsiones claras y transparentes suelen tener un IR constante, y en el caso de sistemas (o/w) los valores de IR tienden a acercarse al del agua pura, reflejando la dominancia de la fase acuosa continua.

En conjunto, estos parámetros fisicoquímicos pueden obtenerse mediante técnicas simples, rápidas y no invasivas, lo que las convierte en herramientas útiles para confirmar la formación de microemulsiones y monitorear la estabilidad fisicoquímica de las mismas durante el almacenamiento a corto, mediano y largo plazo y bajo diferentes condiciones.

[69] Lunardi, C. N., Gomes, A. J., Rocha, F. S., De Tommaso, J., & Patience, G. S. (2021). Experimental methods in chemical engineering: Zeta potential. *The Canadian Journal of Chemical Engineering*, *99*(3), 627-639.
[70] Clogston, J. D., & Patri, A. K. (2010). Zeta potential measurement. En *Characterization of nanoparticles intended for drug delivery* (pp. 63-70). Totowa, NJ: Humana press.

1.2.2.7 Morfología de las microemulsiones

El estudio de la morfología de los sistemas obtenidos permite no solo corroborar la formación de microemulsiones sino también estimar el tamaño de las gotas y su distribución, lo que complementa los resultados obtenidos por otras técnicas como DLS. Con este fin, en la mayoría de los casos, se emplea la microscopía electrónica de transmisión (TEM, del inglés *transmission electron microscopy*) la cual permite visualizar la estructura esférica de las gotas y observar su superficie lisa (Figura 1.9). TEM utiliza un fino haz de electrones acelerados a gran velocidad como fuente de iluminación. Cuando este haz atraviesa la muestra, se produce la dispersión de los electrones en diferentes trayectorias según la característica estructural de la misma. Se obtiene entonces una imagen aumentada de alta resolución que puede visualizarse en tiempo real y ser registrada digitalmente. Sin embargo, una desventaja de esta técnica es que requiere una extensa preparación de la muestra, lo que lo convierte en un proceso que consume mucho tiempo.

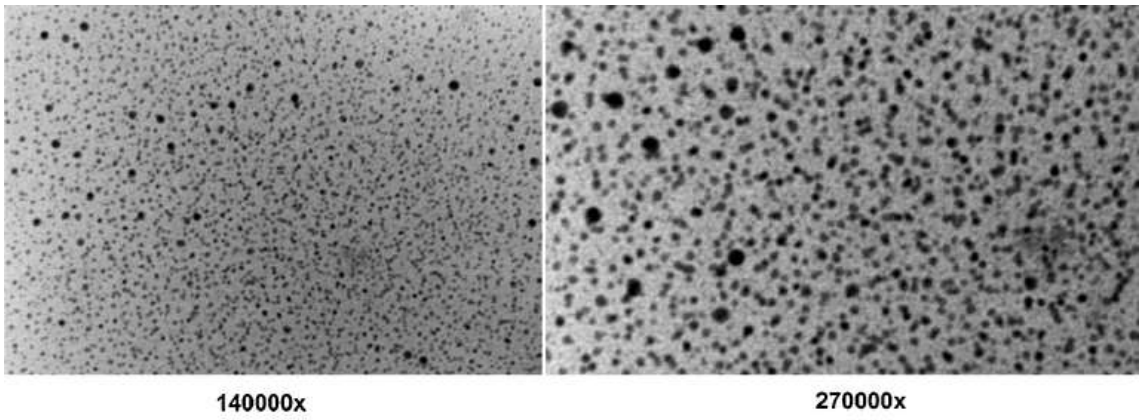


Figura 1.9. Imágenes obtenidas por TEM correspondientes a una microemulsión (o/w) portadora del filtro químico solar octil p-metoxicinamato desarrollada por Volpe y col.[71] Puede evidenciarse la morfología esférica de las gotas y una distribución de tamaño relativamente uniforme.

1.2.2.8 Microemulsiones como sistemas portadores de administración tópica

[71] Volpe, V., Nascimento, D. S., Insausti, M., & Grünhut, M. (2018). Octyl p-methoxycinnamate loaded microemulsion based on Ocimum basilicum essential oil. Characterization and analytical studies for potential cosmetic applications. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, *546*, 285-292.

Como ya se ha mencionado, las microemulsiones tienen excelentes propiedades de solubilización tanto para compuestos hidrofílicos como lipofílicos. Además de esta importante característica, a menudo los componentes que constituyen una microemulsión pueden actuar como promotores de la permeación de estos compuestos a través de la piel o mucosas. Esto vuelve a las microemulsiones sistemas de gran interés para la administración tópica de fármacos.

Las formulaciones tópicas se definen como aquellas que se aplican en superficies corporales, como la piel o las membranas mucosas. Esta definición puede extenderse si consideramos que una formulación es tópica cuando se aplica en un área localizada del cuerpo o superficie, independientemente de la ubicación del efecto. De esta manera quedan incluidos dentro de las formulaciones tópicas los productos transdérmicos. En este caso, el principio activo si bien es aplicado superficialmente, tiene la capacidad de ser absorbido por la piel o las mucosas para lograr finalmente un efecto sistémico. En particular, las microemulsiones son formulaciones útiles y ampliamente reportadas como sistemas portadores de fármacos para la administración dérmica y transdérmica. Dentro de las ventajas que poseen estos sistemas podemos mencionar la capacidad de aumentar la absorción cutánea de principios activos tanto hidrofílicos como lipofílicos debido probablemente a la mayor solubilidad de los activos en la correspondiente fase, con un gradiente de concentración mejorado hacia la piel[72]. La Tabla 1.7 muestra trabajos recientes relacionados con el desarrollo de microemulsiones como sistemas portadores de activos de acción tópica con diversas funciones como ser antiinflamatoria, antifúngica, anestésica, antibiótica, entre otros. Las microemulsiones además son muy utilizadas en la actualidad como portadoras de agentes cosméticos debido a su elevada estabilidad fisicoquímica y al pequeño tamaño de gota. Diversas formulaciones cosméticas de tipo

[72] Sharma, A. K., Garg, T., Goyal, A. K., & Rath, G. (2016). Role of microemuslsions in advanced drug delivery. *Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology*, *44*(4), 1177-1185.

microemulsión han salido al mercado ya sea como desodorantes y antitranspirantes[73], cremas para la piel[74], limpiadores cutáneos[75], protectores solares[76], entre otros.

Tabla 1.7. Microemulsiones recientemente reportadas como sistemas portadores de uso tópico de acción farmacéutica y cosmética.

Principio activo	Uso	Tipo	Referencia
Clotrimazol Itraconazol	Antifúngico	(w/o)	Ferreira y col.[77]
Vitamina A Vitamina E	Anti-inflamatorio	(o/w)	Praça y col.[78]
Lidocaína	Anestésico	(o/w)	Zhao y col.[79]
Sertaconazol	Antifúngico	(o/w)	Pajic y col.[80]
Ivermectina	Antihelmíntico	(o/w)	Das y col.[81]
Doxepin	Antiinflamatorio	(o/w)	Kaydan y col.[82]

[73] Azeem, A., Rizwan, M., Ahmad, F. J., Khan, Z. I., Khar, R. K., Aqil, M., & Talegaonkar, S. (2008). Emerging role of microemulsions in cosmetics. *Recent patents on drug delivery & formulation*, *2*(3), 275-289.

[74] Alam, R., Chauhan, A. P. S., Singh, H., & Kumar, V. (2024). INNOVATIONS IN MICROEMULSION TECHNOLOGY: A STATE-OF-THE-ART APPROACH FOR TOPICAL DRUG DELIVERY.

[75] von Rybinski, W., Hloucha, M., & Johansson, I. (2009). Microemulsions in cosmetics and detergents. *Microemulsions: Background, New Concepts, Applications, Perspectives*, 230-258.

[76] Syamsidi, A. (2023). Development and Evaluation of Microemulsion-Based Sunscreen Cream Containing Lycopene from Tomato (Solanum lycopersicum L.) En *Development*, *20*(1).

[77] Ferreira, P. G., Noronha, L., Teixeira, R., Vieira, I., Borba-Santos, L. P., Viçosa, A., ... & Ferreira, V. F. (2020). Investigation of a microemulsion containing clotrimazole and itraconazole for transdermal delivery for the treatment of sporotrichosis. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, *109*(2), 1026-1034.

[78] Praça, F. G., Viegas, J. S. R., Peh, H. Y., Garbin, T. N., Medina, W. S. G., & Bentley, M. V. L. B. (2020). Microemulsion co-delivering vitamin A and vitamin E as a new platform for topical treatment of acute skin inflammation. *Materials Science and Engineering: C*, *110*, 110639.

[79] Zhao, Z., Lian, Y., Zhu, Y., Ye, H., Liu, M., & Li, J. (2020). Depot lidocaine-loaded microemulsion for prolonged local anesthesia: Different efficacy model studies. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, *55*, 101404.

[80] Pajic, N. B., Nikolic, I., Mitsou, E., Papadimitriou, V., Xenakis, A., Randjelovic, D., ... & Savic, S. (2018). Biocompatible microemulsions for improved dermal delivery of sertaconazole nitrate: Phase behavior study and microstructure influence on drug biopharamaceutical properties. *Journal of Molecular Liquids*, *272*, 746-758.

[81] Das, S., Lee, S. H., Chia, V. D., Chow, P. S., Macbeath, C., Liu, Y., & Shlieout, G. (2020). Development of microemulsion based topical ivermectin formulations: Pre-formulation and formulation studies. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, *189*, 110823.

[82] Kaydan, H. H., Moghimipour, E., Dalvand, H., Jamali, N., Salimi, A., & Salimi, A. (2025). Design, Preparation, and Ex Vivo Skin Permeation of Doxepin Microemulsion System for Topical Delivery. *Journal of Cosmetic Dermatology*, *24*(1), e16786.

Esparfloxacino	Antibiótico	(o/w)	Dhaval y col.[83]
Benzofenona-3	Protector solar	(o/w) (w/o)	Songkro y col.[84]
Octyl-p-metoxicinamato	Protector solar	(o/w)	Nascimento y col.[85]
Resveratrol	Antiage	(o/w)	Das y col.[86]
Ácido hialurónico	Hidratante	(w/o)	Szumala y col.[87]
Colágeno	Proteína de la piel		
Sulfato ferroso	Antianémico	(w/o)	Alkrad y col.[88]

1.3 Estudios de permeación en piel

La piel es el órgano más extenso del cuerpo humano, cubriendo una superficie de aproximadamente 18.000 cm^2 en un adulto. La capa más superficial de la piel es la epidermis, y esta es quien desarrolla la función defensiva. Como podemos ver en la Figura 1.10, básicamente podemos diferenciar tres estratos que en conjunto proveen la barrera epidérmica. En primer lugar, tenemos el estrato córneo, una capa de células que constituye la barrera externa de primer nivel. En segundo lugar, se encuentran las uniones estrechas, son estructuras de proteínas que forman la barrera interna de segundo nivel y finalmente la barrera inmunológica la cual provee las células de Langerhans. La piel actúa como una barrera o membrana protectora frente a agresiones externas. Es por esto que la penetración y/o retención de un principio activo en la piel va a estar íntimamente relacionado con sus propiedades fisicoquímicas, pero también con las propiedades de la

[83] Dhaval, M., Devani, J., Parmar, R., Soniwala, M. M., & Chavda, J. (2020). Formulation and optimization of microemulsion based sparfloxacin in-situ gel for ocular delivery: in vitro and ex vivo characterization. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, *55*, 101373.
[84] Songkro, S., Lo, N. L., Tanmanee, N., Maneenuan, D., & Boonme, P. (2014). In vitro release, skin permeation and retention of benzophenone-3 from microemulsions (o/w and w/o). *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, *24*(6), 703-711.
[85] Nascimento, D. S., Insausti, M., Band, B. S. F., & Grünhut, M. (2018). Photolysis study of octyl p-methoxycinnamate loaded microemulsion by molecular fluorescence and chemometric approach. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, *191*, 277-282.
[86] Das, S., Lee, S. H., Chow, P. S., & Macbeath, C. (2020). Microemulsion composed of combination of skin beneficial oils as vehicle: Development of resveratrol-loaded microemulsion based formulations for skin care applications. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, *194*, 111161.
[87] Szumała, P., Jungnickel, C., Kozłowska-Tylingo, K., Jacyna, B., & Cal, K. (2019). Transdermal transport of collagen and hyaluronic acid using water in oil microemulsion. *International Journal of Pharmaceutics*, *572*, 118738.
[88] Alkrad, J. A., AlKhatib, H. S., & Musa, R. J. (2019). Formulation, in vitro and in vivo evaluation of ferrous sulfate loaded microemulsions. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, *53*, 101149.

formulación que lo transporte y con el estado de la piel donde se aplique la formulación[89]. Con respecto a los factores fisicoquímicos, la velocidad de liberación del principio activo va a estar relacionada con las propiedades fisicoquímicas que exhiba el sistema portador. Así, el pH de la formulación juega un rol importante en la penetración del activo a través de las membranas lipídicas ya que la forma no ionizada de la molécula es quien atravesará de manera más sencilla las membranas. Por lo tanto, es importante tener en cuenta no solo el pKa de la molécula sino también el pH del medio de formulación y el pH fisiológico. Por otro lado, la lipofilicidad/hidrofilicidad de la molécula también influye en la afinidad relativa que presenta el activo por el sistema portador y por la membrana a través de la cual el mismo difunde[90].

Dentro de los ensayos más utilizados para evaluar la permeación de formulaciones tópicas, podemos identificar dos grandes grupos: los estudios *in-vivo* y los estudios *in-vitro*.

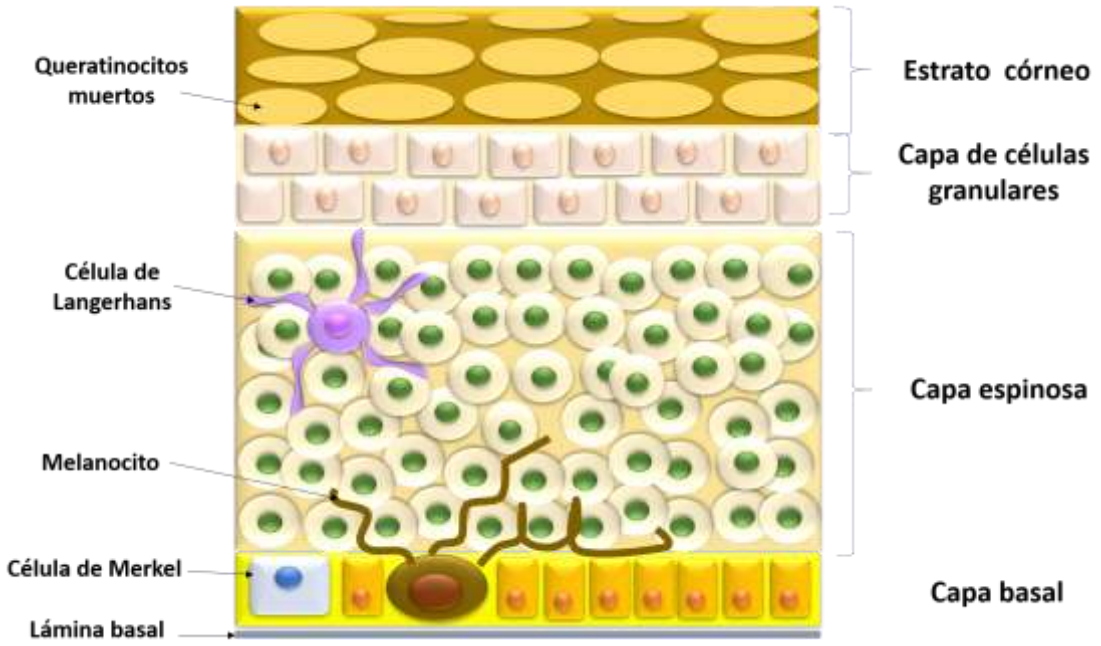


Figura 1.10. Esquema de las diferentes capas de la epidermis.

[89] Ghorbani, N., & Salabat, A. (2025). Evaluation of novel microemulsions and microemulgels containing herbal oils as skin care and topical drug delivery systems for celecoxib. *Journal of Molecular Liquids*, 127163.

[90] Schoenwald, R. D., & Ward, R. L. (1978). Relationship between steroid permeability across excised rabbit cornea and octanol–water partition coefficients. *Journal of pharmaceutical sciences, 67*(6), 786-788.

1.3.1 Estudios de permeación *in-vivo*

En este caso se evalúa la penetración de las formulaciones a través de la piel utilizando animales o humanos. Dentro de estos ensayos se pueden mencionar la biopsia cutánea, la cual permite evaluar la cantidad de droga que penetra a través de las diferentes estructuras de la piel en función del tiempo, y la extracción del estrato córneo mediante cinta adhesiva para evaluar la progresión de una droga a través del mismo[91], entre otros. Los autores Wang y col.[92] desarrollaron y caracterizaron una microemulsión para la administración tópica de dencichina, un aminoácido presente en *Panax ginseng*, ampliamente reportado por sus propiedades hemostáticas. Así, llevaron a cabo estudios farmacodinámicos *in-vivo* utilizando ratas como modelo. La correlación entre la permeación cutánea *in-vitro* y la actividad farmacodinámica *in-vivo* de la formulación se evaluó mediante ensayos de tiempo de sangrado y coagulación plasmática, lo que indicó significativa actividad hemostática. Por otra parte, Savić y col.[93] desarrollaron microemulsiones como sistemas portadores de tacrolimus para el tratamiento de la dermatitis atópica. Para evaluar la penetración *ex-vivo* del fármaco en el estrato córneo, utilizaron la técnica de desprendimiento con cinta adhesiva sobre piel de oreja de cerdo. Los resultados demostraron que las microemulsiones formuladas constituyen vehículos prometedores para la administración dérmica de tacrolimus.

Si bien los ensayos *in-vivo* son importantes para validar la eficacia y seguridad de las formulaciones en un entorno biológico complejo, presentan ciertas limitaciones que deben considerarse. Entre las principales se encuentran los aspectos éticos asociados al uso de animales de laboratorio, que requieren una justificación sólida y la aprobación por comités de ética. Además, estos modelos pueden no reproducir con exactitud las condiciones fisiológicas humanas, lo que limita en algunos casos la extrapolación directa de los resultados. La variabilidad biológica entre individuos, los costos elevados, el tiempo necesario para la ejecución de los ensayos y la necesidad de instalaciones

[91] Zysk, W., & Trzeciak, M. (2024). Tape Stripping—Searching for Minimally Invasive Biomarkers in Atopic Dermatitis. *Dermatology Practical & Conceptual, 14*(2), e2024123.
[92] Wang, C., Zhu, J., Zhang, D., Yang, Y., Zheng, L., Qu, Y., ... & Cui, X. (2018). Ionic liquid–microemulsions assisting in the transdermal delivery of Dencichine: Preparation, in-vitro and in-vivo evaluations, and investigation of the permeation mechanism. *International journal of pharmaceutics, 535*(1-2), 120-131.
[93] Savić, V., Todosijević, M., Ilić, T., Lukić, M., Mitsou, E., Papadimitriou, V., ... & Savić, S. (2017). Tacrolimus loaded biocompatible lecithin-based microemulsions with improved skin penetration: Structure characterization and in vitro/in vivo performances. *International journal of pharmaceutics, 529*(1-2), 491-505.

especializadas también representan desafíos importantes. Por estas razones, se promueve el uso de enfoques alternativos y complementarios, como los estudios *in-vitro*, los cuales permiten reducir, refinar y reemplazar el uso de animales siempre que sea posible.

1.3.2 Estudios de permeación *in-vitro*

Uno de los principales estudios *in-vitro* utilizados para evaluar la permeación de compuestos en formulaciones tópicas es la celda de difusión de Franz[94]. Como puede verse en la Figura 1.11 este sistema está compuesto por dos compartimentos, uno donor y otro aceptor, separados por una membrana que puede ser de origen animal, humana o sintética y que simula la piel. El compartimento donor contiene la formulación que se desea evaluar y el compartimento aceptor contiene una solución aceptora que simula las condiciones fisiológicas de la piel. La membrana utilizada actúa como separador entre ambos compartimentos. Así, es posible evaluar la cinética de difusión de los compuestos de interés cuando éstos difunden de un compartimento a otro a través de la membrana. Es importante tener en cuenta durante el estudio de permeación los diversos parámetros que influyen en la difusión de los compuestos de interés. Dentro de ellos se puede mencionar la temperatura, agitación, el tipo y naturaleza de la membrana y la solución aceptora utilizada.

[94] Franz, T. J. (1975). Percutaneous absorption. On the relevance of in vitro data. *Journal of Investigative Dermatology, 64*(3), 190-195.

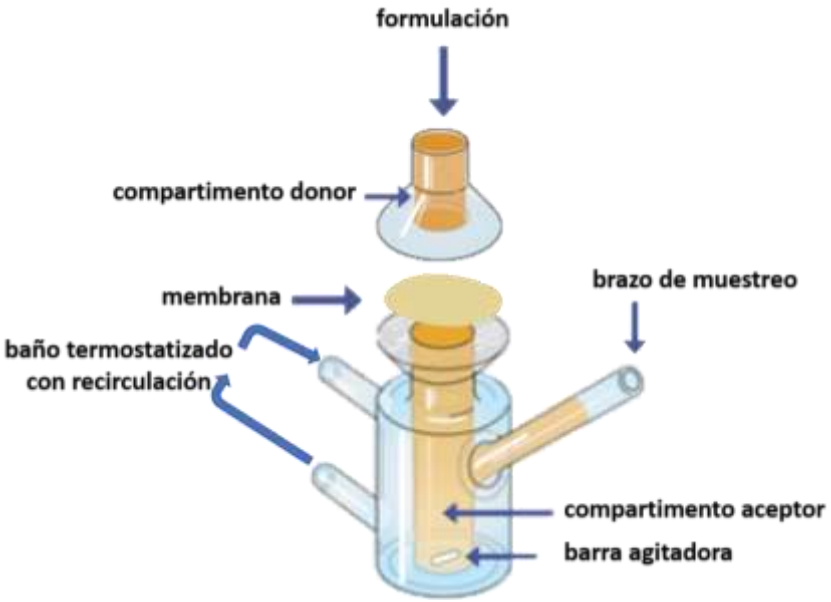


Figura 1.11. Representación esquemática de una celda de difusión de Franz utilizada para llevar a cabo estudios de permeación in-vitro de formulaciones.

En primer lugar, la temperatura debe ser la suficiente para favorecer las interacciones de tipo soluto-solvente, ya que para que el proceso de difusión ocurra es muy importante que el compuesto de interés sea soluble en la solución aceptora. Además, debe procurarse una temperatura que se encuentre dentro del rango fisiológico de la piel, de modo de emular las condiciones normales. Esta variable puede controlarse mediante un baño termostatizado con recirculación (Figura 1.11). Por otro lado, la agitación es de suma importancia para favorecer la solubilidad de los compuestos en el medio aceptor y mantenerla en el tiempo, evitando la formación de precipitados. Además, la agitación en el compartimento aceptor provoca una difusión homogénea de los compuestos, alejando los mismos de la interfase con la membrana y favoreciendo de esta manera el pseudo-equilibrio. Por ello, la celda de difusión de Franz se acopla a un sistema de agitación magnética en el cual la barra de agitación queda sumergida en el compartimento aceptor (Figura 1.11), de modo de garantizar una correcta difusión.

Otro aspecto a considerar es que en los estudios de permeación para formulaciones tópicas las membranas que separan físicamente ambos compartimentos deben comportarse de manera similar al tejido en estudio, es decir, la piel. Las membranas

utilizadas pueden clasificarse en dos grandes grupos[95]: las membranas biológicas y las membranas sintéticas o artificiales. Dentro del primer grupo se encuentran las membranas de piel humana y de modelos animales como cerdo, conejo, rata, ratón sin pelo, conejillo de indias y ratón. Por otro lado, las membranas sintéticas pueden ser polímeros como acetato de celulosa, poliamida, polietileno, nylon, etc. Este último grupo es actualmente el más utilizado para estudios de formulaciones tópicas en etapa temprana de investigación, ya que las membranas sintéticas no necesitan de un almacenamiento especial y no requieren un pre-tratamiento complejo. Además, estas membranas presentan en general bajo costo y evitan la utilización de material biológico, el cual suele involucrar una manipulación y condiciones de conservación más complejas. La Tabla 1.8 muestra distintos trabajos donde se han empleado membranas sintéticas para abordar estudios de permeación en formulaciones de uso tópico.

Tabla 1.8. Tipos de membranas y soluciones aceptoras usadas en estudios de permeación de formulaciones.

Compuesto	Membrana	Tipo de polímero	Poro (µm)	Solución aceptora	Referencia
Rivastigmina	Strat-M™	Polietersulfona - poliolefina	325 (tri-capa)	PBS (pH =7,4)	Simon y col.[96]
Peróxido de benzoilo	Nylon	Poliamida	0,45	AN:agua (50:50 v/v)	Brighenti y col.[97]

[95] Haq, A., Dorrani, M., Goodyear, B., Joshi, V., & Michniak-Kohn, B. (2018). Membrane properties for permeability testing: Skin versus synthetic membranes. *International journal of pharmaceutics*, *539*(1-2), 58-64.

[96] Simon, A., Amaro, M. I., Healy, A. M., Cabral, L. M., & de Sousa, V. P. (2016). Comparative evaluation of rivastigmine permeation from a transdermal system in the Franz cell using synthetic membranes and pig ear skin with in vivo-in vitro correlation. *International journal of pharmaceutics*, *512*(1), 234-241.

[97] Brighenti, M. D. S., Montanheri, L. R. D. S., Duque, M. D., Andreo-Filho, N., Lopes, P. S., Garcia, M. T. J., ... & Leite-Silva, V. R. (2025). In Vitro Drug Release and Ex Vivo Dermal Drug Permeation Studies of Selected Commercial Benzoyl Peroxide Topical Formulations: Correlation Between Human and Porcine Skin Models. *Molecular Pharmaceutics*.

Niacinamida	Nucleopore®	Polycarbonate	0,20	agua desionizada	Tiyaboonchai col.[98]
Acido ferúlico	Millipore®	Acetato de celulosa	0,10	PBS + 2,5% Tween 80 (pH = 7,4)	Duarte y col.[99]
Miconazol nitrato	Epiderm	Acetato de celulosa	0,45	PBS + 5 % DMS (pH = 7,4)	Shahid y col.[100]

AN: acetonitrilo; DMS: dimetilsulfóxido; PBS: buffer fosfato.

En cuanto a la solución aceptora que se utiliza en los estudios de permeación, se debe tener en cuenta la solubilidad de los activos en estudio y el pH, teniendo en cuenta que la misma debe simular las condiciones fisiológicas del tejido. Por ello, suelen utilizarse soluciones tamponadas o mezclas acuosas. La Tabla 1.8 muestra distintos trabajos donde se han empleado diferentes soluciones aceptoras en estudios de permeación de formulaciones tópicas.

Finalmente, los estudios de permeación utilizando la celda de difusión de Franz se completan tomando alícuotas de la solución aceptora durante determinados intervalos de tiempo por medio de una jeringa que se introduce en el tubo de muestreo (Figura 1.11). Las muestras son luego analizadas mediante alguna técnica analítica, en general una técnica separativa como HPLC (del inglés, *high performance liquid chromatography*). Así, con los datos obtenidos se obtienen las correspondientes curvas de permeación y se calculan las respectivas constantes, las cuales aportan información valiosa sobre la

[98] Tiyaboonchai, W., Ngammuangman, P., Pan-On, S., & Pham, D. T. (2025). Development of niacinamide loaded elastic liposome as a potential transepidermal delivery system. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*.

[99] Duarte, F. Í. C., de Mendonça Costa, A. B. S., Vieira Filho, J. F., Freite, V. L. P., Freire, J. V. A., Converti, A., ... & de Lima, Á. A. N. (2021). In vitro release studies of ferulic acid in semi-solid formulations with optimized synthetic membrane. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, *61*, 102106.

[100] Shahid, M., Alrumayyan, B. F., Ramzan, M., Ahmed, F. J., Malik, A., Khuroo, T., & Alaofi, A. L. (2023). Impact of miconazole nitrate ferrying cationic and anionic nanoemulsion and gels on permeation profiles of across EpiDerm, artificial membrane, and skin: Instrumental evidences. *International Journal of Pharmaceutics*, *648*, 123593.

cinética de difusión de los activos de interés luego de atravesar una membrana que representa la piel.

No obstante, los estudios que incluyen la celda de difusión de Franz tienen una gran cantidad de pasos que se realizan manualmente, tal como el agregado de muestra en el compartimento donor, la toma de muestra del compartimento aceptor, así como la correspondiente reposición de dicho volumen extraído. Además, la determinación de los componentes activos que permean a través de la membrana se realiza *off-line*, ya que como se mencionó anteriormente las muestras son analizadas habitualmente por técnicas separativas como HPLC. En estos casos, los métodos demandan largos tiempos de análisis, consumo de solventes tóxicos, generación de residuos contaminantes y suelen ser de alto costo debido al equipamiento e insumos (columnas, solventes calidad HPLC, etc.) utilizados. Una alternativa para mejorar la factibilidad de este tipo de estudios puede ser la automatización del procedimiento y el acoplamiento de técnicas espectroscópicas de detección. El uso de métodos automáticos en línea con detección espectrométrica por absorción molecular UV-Vis y/o fluorescencia molecular puede considerarse una alternativa para superar varios de los problemas previamente mencionados[101]. Además, estos sistemas pueden facilitar el monitoreo en tiempo real, proporcionando una frecuencia de muestreo más alta y facilitando la sustitución de procedimientos manuales largos y laboriosos[74].

1.4 Desarrollo de métodos analíticos aplicados a microemulsiones

El diseño de nuevos métodos analíticos para el estudio de sistemas organizados, como las microemulsiones, representa un reto significativo dentro de la *Química Analítica*. Esto se debe a que las propiedades fisicoquímicas de las especies químicas en estos medios pueden diferir notablemente en comparación con otros entornos. Como resultado, en muchas ocasiones, los métodos analíticos convencionales no son aplicables cuando la especie química forma parte de una microemulsión. Por ello, el desarrollo de estrategias analíticas adaptadas a estos sistemas constituye un avance innovador en la

[101] Razuc, M. F., Grünhut, M., Garrido, M., & Band, B. S. F. (2014). Second order advantage applied to the spectrophotometric analysis of ciprofloxacin and dexamethasone in ophthalmic drops; automatic green method using on-line photodegradation. *Analytical Sciences*, *30*(12), 1121-1127.

disciplina, ya que requiere considerar tanto el medio en el que se encuentra la especie química como su comportamiento en una estructura organizada. En particular, resulta imprescindible desarrollar métodos analíticos que permitan evaluar la efectividad y la estabilidad de nuevas formulaciones. Aunque existe una serie de metodologías para el estudio de rutina de formulaciones en el campo farmacéutico y de cosmética, muchas de ellas involucran la implementación de técnicas separativas, tales como GC (del inglés, *gas chromatography*) o HPLC, las cuales usan solventes orgánicos y además consumen energía y tiempo. Por ello, en los últimos años, puede observarse una marcada tendencia al desarrollo de procedimientos más amigables con el ambiente. Los principios de la *Química Analítica Verde* (GAC, del inglés *green analytical chemistry*) recomiendan el uso de solventes más seguros y menos tóxicos, promueven tanto la reducción del consumo de energía como la disminución en la generación de residuos, evitan la derivatización y promueven el uso de sustancias de fuentes renovables, entre otros[102] (Figura 1.12). Por ello, la correcta aplicación de estos principios proporciona muchos beneficios relacionados con la sustentabilidad.

[102] Anastas, P. T., & Kirchhoff, M. M. (2002). Origins, current status, and future challenges of green chemistry. *Accounts of chemical research*, *35*(9), 686-694.

Figura 1.12. Los doce principios de la Química Analítica Verde (GAC).

En este sentido, las técnicas de flujo facilitan el desarrollo de métodos analíticos simples, rápidos, económicos y amigables con el ambiente. Dichas técnicas están basadas en sistemas que utilizan un medio de propulsión de fluidos (bomba peristáltica, bomba pistón, jeringas, etc.), canales de circulación (tubos de PTFE de diámetro variable) y válvulas para direccionar fluidos (válvulas de selección, válvulas solenoides, etc.). Estos sistemas pueden acoplarse fácilmente a diferentes módulos tanto para la etapa de pre-tratamiento de muestras como a diversos detectores, principalmente espectrométricos como absorción molecular UV-Vis o fluorescencia molecular, entre otros. Esto favorece la transferencia e implementación de metodologías debido principalmente a que estas técnicas de detección son de fácil uso y presentan bajo mantenimiento y costo. Además, una de las principales ventajas de estas técnicas es su capacidad para generar grandes

volúmenes de datos cuando la instrumentación lo permite. No obstante, en algunos casos, la selectividad puede resultar limitada ya que numerosas moléculas presentan absorción en la región UV-Vis o emiten radiación tras ser excitadas, lo que puede generar interferencias y dificultar la identificación precisa de los analitos de interés. En este sentido, Nascimento y col.[85] desarrollaron una microemulsión (o/w) portadora del filtro químico solar octil p-metoxicinamato (OMC). Debido a que el OMC se fotodegrada en presencia de radiación UV se realizó un estudio de fotólisis de la formulación cargada utilizando un sistema de flujo continuo con detección *on-line* por fluorescencia molecular. Los datos espectrales fueron analizados por resolución multivariada de curvas con cuadrados mínimos alternantes (MCR-ALS, del inglés *multivariate curve resolution-alternating least squares*). Los resultados obtenidos demostraron una mayor fotoestabilidad del isómero *trans*-OMC al cargarse en el vehículo propuesto, en comparación con el *trans*-OMC libre en medio acuoso. Posteriormente, Volpe y col.[71] diseñaron una microemulsión (o/w) cuya fase oleosa estuvo constituida por aceite esencial de *Ocimum basilicum* el cual presenta actividad repelente de insectos. En este caso también se demostró la mayor fotoestabilidad del OMC en la microemulsión (o/w) con respecto al OMC libre por medio de un estudio similar utilizando un sistema de flujo continuo con detección fluorescente y tratamiento quimiométrico de datos.

Por otra parte, el desarrollo de nuevas metodologías analíticas puede mejorarse significativamente debido a los avances en electrónica y a la tecnología 3D. Arduino[103] permite construir dispositivos digitales y dispositivos interactivos para sensar y controlar diferentes objetos, incluyendo aparatos e instrumentos. Las principales ventajas de Arduino son la facilidad de uso, el bajo costo de los componentes, y que tanto el hardware como el software son libres. Las placas Arduino están disponibles comercialmente como placas ensambladas o también en forma de kits, y usan diversos microcontroladores y microprocesadores. La mayoría de las placas Arduino se alimentan por puerto USB y pueden ser programadas a través de una computadora. Por otro lado, la fabricación de piezas o componentes de distintos materiales, con alta precisión y elevado nivel de detalle, se ha mejorado significativamente gracias a la tecnología 3D, lo que ha resultado de gran

[103] Shield, A. W. (2013). Arduino. Dostopno na: https://www. arduino. cc/en/Guide/ArduinoWiFiShield [11. 8. 2017].

aplicación para el desarrollo de dispositivos analíticos[104]. En particular, la tecnología 3D se ha incorporado en herramientas tradicionalmente utilizadas en la fabricación de piezas como son las fresadoras. Una fresadora es una herramienta utilizada para realizar trabajos mecanizados por arranque de viruta mediante el movimiento de una herramienta rotativa de varios filos de corte denominada fresa. Mediante el fresado se pueden mecanizar diversos materiales como hierro, acero, aluminio, PTFE, acrílico, entre otros. En una fresadora 3D la herramienta se desplaza acercándose a la zona a mecanizar, pudiendo generar ranuras, dentados, roscas, canales, etc., de diferente forma y tamaño y con una altísima precisión, lo que es particularmente útil en el diseño de componentes o piezas para desarrollar sistemas de flujo. La fabricación de una pieza mediante tecnología 3D requiere como primer paso realizar el diseño de la misma en una computadora para lo cual se utilizan programas más o menos complejos en función del objetivo y de la capacitación del operador (AutoCAD, 123D Autodesk, entre otros). Luego, se deberá seleccionar el material y el tipo de impresora que mejor se ajuste al diseño realizado, y finalmente se definirá el proceso por el cual se imprimirá la pieza deseada.

[104] Nario, N. A., Vidal, E., Grünhut, M., & Domini, C. E. (2023). 3D-printed device for the kinetic determination of As (III) in groundwater samples by digital movie analysis. *Talanta, 261*, 124625.

Capítulo 2

Obtención, caracterización y estudios analíticos de una microemulsión portadora del filtro químico solar benzofenona-3

2.1 Objetivos

Desarrollar una microemulsión (o/w) portadora de benzofenona-3 que presente actividad protectora solar, para un potencial uso tópico, a partir de materiales biocompatibles y aceptados por la normativa vigente para uso cosmético. Obtener y caracterizar fisicoquímicamente el sistema propuesto, llevar a cabo estudios analíticos para evaluar la permeación y la estabilidad térmica del mismo, y abordar estudios *in-vitro* para la determinación del factor de protección solar que permita evaluar su eficacia como protector solar.

2.2 Introducción

La radiación ultravioleta que llega a la tierra es parcialmente absorbida por la capa de ozono presente en la atmósfera terrestre. De esta manera, los rayos UVC (longitud de onda 100-290 nm) son completamente absorbidos, los UVB (longitud de onda 290-320 nm) son absorbidos parcialmente (alrededor de un 5%) mientras que los rayos UVA (longitud de onda 320-400 nm) son aquellos que finalmente llegan en mayoría a la superficie terrestre (aproximadamente el 95%). Está ampliamente demostrado que ambos tipos de radiación (UVA y UVB) son capaces de provocar daños en el ADN[105]. Mientras que los rayos UVB dañan la piel y provocan pigmentación, quemaduras e incluso algunos cánceres de piel, los rayos UVA penetran más profundamente en la dermis y provocan arrugas y eritema además de causar daño en el ADN llevando al fotoenvejecimiento de la piel mediante la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS, del inglés *reactive oxygen species*)[106]. Se ha evidenciado que la exposición solar sin protección adecuada puede provocar daños acumulativos en la piel, tales como quemaduras, fotoenvejecimiento e incluso algunos tipos de cáncer[107].

Desde comienzos de los años setenta se ha detectado en todo el mundo un pronunciado incremento de la incidencia de cánceres de piel principalmente en poblaciones de piel clara, estrechamente vinculado a las costumbres personales de exposición al sol y a la percepción social de que el bronceado es deseable y saludable. Cada año, se producen en todo el mundo entre dos y tres millones de casos de cáncer de piel no melánico y aproximadamente 132.000 casos de cáncer de piel melánico[108]. En Argentina, de acuerdo con diversos reportes, varias regiones del país reciben niveles de radiación solar UV muy altos que son peligrosos para las personas. Como ejemplo podemos citar un estudio que relevó la variación anual del índice UV de acuerdo a

[105] Artosi, F., Costanza, G., Di Prete, M., Garofalo, V., Lozzi, F., Dika, E., ... & Campione, E. (2024). Epidemiological and clinical analysis of exposure-related factors in non-melanoma skin cancer: A retrospective cohort study. *Environmental Research*, *247*, 118117.
[106] Geoffrey, K., Mwangi, A. N., & Maru, S. M. (2019). Sunscreen products: Rationale for use, formulation development and regulatory considerations. *Saudi Pharmaceutical Journal*, *27*(7), 1009-1018.
[107] Mustieles, V., Balogh, R. K., Axelstad, M., Montazeri, P., Márquez, S., Vrijheid, M., ... & Andersson, A. M. (2023). Benzophenone-3: Comprehensive review of the toxicological and human evidence with meta-analysis of human biomonitoring studies. *Environment international*, *173*, 107739.
[108] Butron Poma, J. (2024). Evaluación y comparación de los niveles de radiación ultravioleta entre la zona urbana y playa de la ciudad de Juli–2024.

distintas concentraciones de ozono para la ciudad de Mar del Plata, provincia de Buenos Aires. Se observó que los valores máximos se encuentran en los meses de diciembre, enero y febrero, obteniendo un índice UV de 14 para 250 UD (Unidades Dobson: unidad que se utiliza para medir concentración de ozono), mientras que para 325 UD fue de 10. Considerando la clasificación de la OMS, estos valores corresponden a la categoría IUV extremos y muy altos, respectivamente[109]. Por otro lado, según la Agencia Internacional de Investigación sobre Cáncer (IARC), el 52,8% de los casos de melanoma en nuestro país pueden ser atribuidos a la exposición a rayos UV, lo cual ubica a Argentina entre los países con riesgo medio, en un rango entre 32,1 y 53,5%. Además, se prevé que para el 2030 los no melanomas incrementarán un 23% y los melanomas un 19%[110].

En este sentido, es fundamental contribuir a fortalecer los tres pilares de la fotoprotección, los cuales se basan en la modificación del comportamiento que conduce a un exceso de exposición a la radiación UV, el uso de ropa y gafas de protección y, por último, el uso de cantidades adecuadas de protector solar como un complemento de estas estrategias de protección.

2.2.1 Filtros Solares

Está siendo ampliamente promovido el uso de productos dermocosméticos que provean protección frente a las radiaciones UV en todo su rango espectral, incluyendo la radiación UVA y UVB ya que, como se ha mencionado, la radiación UVC no penetra la capa de ozono y por ende no estamos expuestos a la misma. Los filtros UV utilizados como protectores solares pueden dividirse en dos grandes grupos según su mecanismo de acción: *filtros minerales o inorgánicos* y *filtros químicos u orgánicos*. Por un lado, los filtros inorgánicos actúan reflejando y dispersando la radiación ultravioleta. Ejemplos de este tipo de compuestos son el dióxido de titanio (TiO_2) y el óxido de zinc (ZnO). Si bien proveen alta estabilidad y mínima sensibilidad alérgica, suelen dejar un residuo blanco en la piel por lo que no se consigue buena adherencia al uso continuo de formulaciones con

[109] Stadler, C., Wolfram, E., Carmona, F., & Orte, F. (2017). Estudio del impacto de la radiación solar Ultravioleta en las personas por medio de información de satélite. Argentina. Recuperado de: https://www. researchgate. net/profile/Carla-Stadler-3/publication/334000976_ESTUDIO_DEL_IMPACTO_DE_LA_RADIACION_SOLAR_ULTRAVIOLETA_EN_LAS_PERSONAS_POR_MEDIO_DE_INFORMACION_DE_SATELITE.

[110] [Instituto Nacional del Cáncer, Ministerio de Salud de la Nación. https://www.argentina.gob.ar/salud/instituto-nacional-del-cancer/estadisticas/incidencia

este tipo de filtros. Por otro lado, los filtros químicos u orgánicos absorben la radiación UV y la transforman en energía térmica que posteriormente es liberada a través de la piel. Estos filtros se pueden agrupar de acuerdo a su estructura química en derivados de la benzofenona, derivados del ácido p-aminobenzoico, salicilatos, metoxicinamatos, derivados del alcanfor, derivados de la triazina, derivados del benzotriazol, derivados del bencimidazol, entre otros[111]. En general, estos compuestos presentan una mejor apariencia estética por lo que habitualmente son los más elegidos. Sin embargo, pueden absorberse fácilmente debido a su naturaleza altamente lipofílica lo que puede tener como consecuencia efectos adversos y disminuir el tiempo de protección[109]. Por ello, es de interés el desarrollo de sistemas portadores que puedan controlar la absorción de este tipo de activos y permitan de esta manera mejorar la eficacia del producto. La Tabla 2.1 muestra los filtros solares comúnmente utilizados y sus concentraciones permitidas según Resolución GMC N° 44/15 del Grupo Mercado Común del MERCOSUR[112].

Tabla 2.1. Lista de filtros UV permitidos por el MERCOSUR para productos de higiene personal, cosméticos y perfumes.

Nombre Químico	Nomenclatura INCI[a]	Cantidad[b]
Metilsulfato de N,N,N-trimetil-4-(2, oxoborn-3- ilidenometil)anilinio	CAMPHOR BENZALKONIUM METHOSULFATE	6%
3,3'(1,4-fenilendimetilen)bis(ácido 7, 7-dimetil-2-oxo-biciclo-(2.2.1) 1-heptilmetano sulfónico y sus sales	TEREPHTHALYLIDENE DICAMPHOR SULFONIC ACID (& SAL TS)	10%*
1-(4-ter-butilfenil)-3-(4-metoxifenil) propano-1,3-diona	BUTYL METHOXYDIBENZOYLMETHANE	5%

[111] Rastogi, S. C. (2002). UV filters in sunscreen products− a survey. *Contact dermatitis*, *46*(6), 348-351.

[112] MERCOSUR/GMC. (2015). *Reglamento técnico MERCOSUR sobre lista de filtros ultravioletas permitidos para productos de higiene personal, cosméticos y perfumes (Resolución GMC N° 44/15)*.

Ácido alfa-(2-oxoborn-3-ilideno)tolueno-4-sulfónico y sus sales de potasio, sodio y trietanolamina	BENZYLIDENE CAMPHOR SULFONIC ACID & SALTS	6% *
2-Ciano-3,3'-difenilacrilato de 2-etilhexilo	OCTOCRYLENE	10% *
4-Metoxicinamato de 2-etoxietilo	CINOXATE	3%
2,2'-dihidroxi-4-metoxibenzofenona	BENZOPHENONE-8	3%
Antranilato de mentilo	MENTHYL ANTHRANILATE	5%
Salicilato de trietanolamina	TEA-SALICYLATE	12%
Ácido 2-fenilbenzimidazol-5-sulfónico y sus sales de sodio, potasio y trietanolamina	PHENYLBENZIMIDAZOLE SULFONIC ACID (& SODIUM, POTASSIUM, TEA SALTS)	8%*
4-Metoxi-cinamato de 2-etilhexilo	ETHYLHEXYL METHOXYCINNAMATE	10%
2-Hidroxi-4-metoxi-benzofenona	BENZOPHENONE-3	10%**
Ácido 2-hidroxi-4 -metoxibenzofenona-5-sulfónico	BENZOPHENONE-4 (ACID)	10%*
Sal de sodio del ácido 2-hidroxi-4-metoxibenzofenona-5-sulfónico	BENZOPHENONE-5	5%*
Ácido 4-aminobenzoico	PABA	15%

Salicilato de homomentilo	HOMOSALATE	15%
Polímero de N-{(2 y 4)[(2-oxoborn-3-ilideno) metil] bencil} acrilamida	POLYACRYLAMIDOM ETHYL BENZYLIDENE CAMPHOR	6%
Dióxido de titanio	TITANIUM DIOXIDE	25%
N-Etoxi-4-aminobenzoato de etilo	PEG-25 PABA	10%
4-Dimetil-aminobenzoato de 2-etillhexilo	ETHYLHEXYL DIMETHYL PABA	8%
Salicilato de 2-etilhexilo	ETHYLHEXYL SALICYLATE	5%
4-Metoxicinamato de isopentilo	ISOAMYL p-METHOXYCINNAMATE	10%
3-(4'-metilbencilideno)-d-l-alcanfor	4-METHYLBENZYLIDENE CAMPHOR	4%
3-Bencilideno alcanfor	3-BENZYLIDENE CAMPHOR	2%
2,4,6-trianilin-(p-carbo-2'etil-hexil-1'-oxil)-1,3,5,-triazina	ETHYLHEXYL TRIAZONE	5%
Óxido de zinc	ZINC OXIDE	25%

2-(2H-benzotriazol-2-il)-4-metil-6-{2-metil-3-(1,3,3,3-tetrametil-1-((trimetilsilil)oxi)disiloxanil)propil}fenol	DROMETRIZOLE TRISILOXANE	15%
Ácido benzoico,4,4'-[6[6-[4[4(1,1-dimetiletil)amino]carbonil]fenil]amino]-1,3,5,-triazina-2,4-diil]diimino]bis-,bis(2-etilhexil) éster	DIETHYLHEXYL BUTADOMI TRIAZONE	10%
2,2'-metileno-bis-6-(2H-benzotriazol-2-il)-4-(tetrametil-butil)-1,1,3,3-fenol	METHYLENE BIS-BENZOTRIAZOLYL TETRAMETHYLBUTYLPHENOL	10%
Sal monosódica del ácido 2,2'-bis-(1,4-fenilen)-1H-bencimidazol-4,6-disulfónico	DISODIUM PHENYL DIBENZIMIDAZOLE TETRASULFONATE	10%*
(1,3,5)-triazina-2,4-bis{[4-(2-etil-hexiloxi)-2-hidroxi]-fenil}-6-(4-metoxifenil)	BIS-ETHYLHEXYLOXYPHENOL METHOXYPHENYL TRIAZINE	10%
Dimeticodietilbenzalmalonato	POLYSILICONE-15	10%
Ácido benzoico,2-[4-(dietilamino)-2-hidroxibenzoil]-,hexilester	DIETHYLAMINO HYDROXYBENZOYL HEXYL BENZOATE	10%
1,3,5-Triazina,2,4,6-Tris([1,1'-Bifenil]-4-il)	TRIS-BIPHENYL-TRIAZINE	10%***

a Nomenclatura internacional de ingredientes cosméticos (INCI, del inglés International Nomenclature of Cosmetic Ingredients); b Cantidad máxima permitida por Grupo Mercado Común (MERCOSUR); * Porcentaje expresado como ácido; **Para concentraciones mayores que 0,5 % incluir advertencia en rotulado: "contiene Benzophenone-3;*** Condiciones de uso: Prohibido su uso en sistemas pulverizables (que dispersan partículas en el aire). El nanomaterial debe tener las siguientes características: Tamaño medio de partícula › 80 nm; Pureza ≥ 98 %; sin recubrimiento.

2.2.1.1 Benzofenona-3

La benzofenona-3 ó 2-hidroxi-4-metoxibenzofenona (Figura 2.1) es uno de los filtros químicos más ampliamente utilizados en PFCPs ya que es considerado un filtro solar de amplio espectro (UVA-UVB)[113]. En nuestro país, la concentración máxima permitida de benzofenona-3 (BZ3) en productos de protección solar y cosméticos es del 10,0% (p/p) debiéndose incluir la advertencia "contiene Benzophenone-3" en el rotulado del producto cuando se utilice en concentraciones mayores que 0,5% (p/p), conforme la Resolución GMC Nº 44/2015 del MERCOSUR, que establece los límites de concentración para ingredientes activos en productos cosméticos, incluyendo filtros solares como BZ3[110]. Esta resolución fue incorporada al ordenamiento jurídico nacional mediante la Disposición ANMAT N° 2384/2018[112].

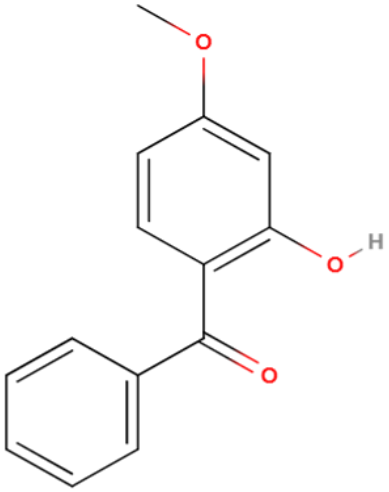


Figura 2.1. Estructura química del filtro solar benzofenona-3 (BZ3).

A pesar de que en los últimos años diversos estudios han cuestionado el uso de filtros químicos orgánicos como BZ3 debido a sus posibles efectos adversos en la salud

[113] Pantelic, M. N., Wong, N., Kwa, M., & Lim, H. W. (2023). Ultraviolet filters in the United States and European Union: A review of safety and implications for the future of US sunscreens. *Journal of the American Academy of Dermatology*, *88*(3), 632-646.

y el ambiente[114,115], una gran cantidad de los productos comerciales disponibles en el mercado contienen una combinación de éstos incluyendo diferentes proporciones de BZ3, tal como se muestra en la Tabla 2.2.

Tabla 2.2. Valores de factor de protección solar (FPS) y composición de formulaciones comerciales que contienen BZ3.

Producto comercial	**FPS**	**Filtro UV**	**Composición (%)**
Solenil®	15	octilmetoxicinamato	n.d
		benzofenona-3	n.d
		benzofenona-4	n.d
Aveeno®	15	salicilato de etilhexilo	5,0
		benzofenona-3	3,0
		butil metoxidibenzoilmetano	3,0
		octocrileno	1,7
Idraet®	50	homosalato	n.d.
		octocrileno	n.d.
		benzofenona-3	n.d.
		salicilato de etilhexilo	n.d.
		butil metoxidibenzoilmetano	n.d.
La Roche-Posay®	50	homosalato	10,0
		benzofenona-3	6,0
		salicilato de etilhexilo	5,0
		octocrileno	5,0
		butil metoxidibenzoilmetano	3,0
		ácido tereftalilideno dicanforsulfónico	2,0
EXEL®	60	benzofenona-3	3,0
		etilhexil metoxicinamato	7,5

[114] Ma, J., Wang, Z., Qin, C., Wang, T., Hu, X., & Ling, W. (2023). Safety of benzophenone-type UV filters: A mini review focusing on carcinogenicity, reproductive and developmental toxicity. *Chemosphere*, *326*, 138455.

[115] Carvalho, P. G., Naveira, R. I., Granone, L. I., Mendive, C. B., Massa, A. E., & Churio, M. S. (2023). A comparative review of natural and synthetic UV filters: Gadusol and benzophenone-3 as representative examples. *Environmental Advances*, *13*, 100404.

	octocrileno	8,0
	dióxido de titanio	5,0

n.d: no declarado

Sin embargo, diversos estudios demuestran que BZ3 presenta bajo ciertas condiciones degradación química y fotolítica[116,117,118] y hasta incluso degradación térmica[119,120], existiendo poca información disponible en este último caso. Por ello, la obtención de un nuevo sistema portador de BZ3 y el estudio de su eficacia y estabilidad puede resultar en un aporte significativo en el campo de desarrollo de este tipo de PFCPs.

Por otro lado, dentro de las metodologías analíticas que comúnmente se emplean para la determinación de filtros químicos solares se pueden mencionar las técnicas cromatográficas[121] ya que las formulaciones que contienen estos compuestos suelen ser matrices complejas que además contienen otros componentes activos y excipientes, siendo necesario entonces un procedimiento separativo. Sin embargo, una de las dificultades que presenta la utilización de este tipo de técnicas es la obtención de información de la muestra en tiempo real, lo que limita el estudio de procesos dinámicos como lo son los procesos de degradación. Por esto, las técnicas espectroscópicas surgen como una alternativa interesante para analizar la muestra en tiempo real debido a su fácil acoplamiento a sistemas de flujo continuo evitando la implementación de procesos separativos que además suelen ser costosos y poco amigables con el ambiente.

[116] Lee, Y. M., Lee, G., & Zoh, K. D. (2021). Benzophenone-3 degradation via UV/H_2O_2 and UV/persulfate reactions. *Journal of hazardous materials*, *403*, 123591.
[117] Pan, X., Yan, L., Li, C., Qu, R., & Wang, Z. (2017). Degradation of UV-filter benzophenone-3 in aqueous solution using persulfate catalyzed by cobalt ferrite. *Chemical engineering journal*, *326*, 1197-1209.
[118] Gong, P., Yuan, H., Zhai, P., Xue, Y., Li, H., Dong, W., & Mailhot, G. (2015). Investigation on the degradation of benzophenone-3 by UV/H2O2 in aqueous solution. *Chemical Engineering Journal*, *277*, 97-103.
[119] Ceresole, R., Asero, M. D., Han, Y. K., Rosasco, M. A., & Segall, A. I. (2013). Evaluation of thermal stability and sun protector factor values in vitro in O/W emulsions containing Benzophenone-3 and Avobenzone.
[120] Beelders, T., de Beer, D., & Joubert, E. (2015). Thermal degradation kinetics modeling of benzophenones and xanthones during high-temperature oxidation of Cyclopia genistoides (L.) Vent. plant material. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *63*(22), 5518-5527.
[121] Chang, N. I., Yoo, M. Y., & Lee, S. H. (2015). Determination of fourteen sunscreen agents in cosmetics using high-performance liquid chromatography. *International Journal of Cosmetic Science*, *37*(2), 175-180.

Se ha descrito que BZ3 absorbe radiación en la región UV a 290 nm. Así, diversos investigadores han logrado monitorear la degradación natural de este compuesto en ambientes acuáticos[122] y han podido cuantificar bajas concentraciones de BZ3 en cuerpos de agua mediante el uso de HPLC-UV[123]. Además, se ha logrado evaluar la biodisponibilidad de BZ3 en formulaciones tópicas[124]. Por otro lado, debido a la estructura química de BZ3, esta molécula es capaz de exhibir fluorescencia molecular, por lo que el uso de esta técnica espectroscópica puede resultar útil para determinar su presencia en diversas matrices.

2.2.2 Factor de protección solar

La efectividad de los filtros UV se suele medir utilizando el factor de protección solar (FPS)[125] el cual refleja la capacidad de protección frente al eritema y por ende solo al efecto de la radiación UVB, no incluyendo otros efectos producidos por la radiación UVA. Así, el FPS se obtiene a través del cociente entre la mínima dosis de radiación necesaria para producir eritema con el filtro solar (aplicado a dosis de 2 mg/cm^2) y la mínima dosis de radiación necesaria para producir eritema en piel no protegida[126]. Por lo tanto, el incremento de protección es lineal en el caso de una quemadura solar pero no lo es en el caso de la radiación UVB absorbida. Por ejemplo, si tomamos el caso de una formulación de FPS 15 y otra de FPS 30, la primera protege la mitad que la segunda. Sin embargo, la formulación de FPS 15 absorbe el 93% de la radiación mientras que la de FPS 30 absorbe el 97% de la misma[127].

---

[122] Chen, D. Y., Guo, X. F., Wang, H., & Zhang, H. S. (2015). The natural degradation of benzophenone at low concentration in aquatic environments. *Water Science and Technology*, *72*(4), 503-509.

[123] Fernandez, C. J., Gomez, N. A., Oresti, G. M., Domini, C. E., & Grünhut, M. (2024). Ionic liquids-based nanoemulsion for assisted by ultrasound liquid–liquid microextraction of UV-filters in water samples. *Microchemical Journal*, *204*, 111007.

[124] Roussel, L., Gilbert, E., Salmon, D., Serre, C., Gabard, B., Haftek, M., ... & Pirot, F. (2015). Measurement, analysis and prediction of topical UV filter bioavailability. *International Journal of Pharmaceutics*, *478*(2), 804-810.

[125] COLIPA, CTFA-SA, JCIA, 2003. International Sun Protection Factor (SPF) test method (COLIPA – The European Cosmetic Toiletry and Perfumery Association; CTFA-SA – Cosmetic, Toiletry & Fragrance Association of South Africa; JCIA – Japan Cosmetic Industry Association)

[126] Stanfield, J., Osterwalder, U., & Herzog, B. (2010). In vitro measurements of sunscreen protection. *Photochemical & Photobiological Sciences*, *9*(4), 489-494.

[127] Dutra, E. A., Oliveira, D. A. G. D. C., Kedor-Hackmann, E. R. M., & Santoro, M. I. R. M. (2004). Determination of sun protection factor (SPF) of sunscreens by ultraviolet spectrophotometry. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, *40*, 381-385.

Si bien el FPS es capaz de determinarse por métodos *in-vivo*, donde se somete a individuos sanos a la exposición de la luz solar artificial durante un período de tiempo a fin de observar la formación de eritema, los costos y la seguridad de este tipo de métodos llevaron a que se utilicen con frecuencia métodos *in-vitro*. Uno de los más utilizados es el método propuesto por Manzur y col.[128] el cual consiste en medir espectrofotométricamente la absorbancia de la muestra a distintas longitudes de onda para luego relacionarlas con el FPS de manera empírica utilizando la Ecuación 2.1:

$$FPS = FC \sum_{290}^{320} \left(EE_{(\lambda)} I_{(\lambda)} A_{(\lambda)} \right) \qquad \text{Ecuación 2.1}$$

donde FC es un factor de corrección; $EE_{(\lambda)}$ es el efecto eritemogénico de la radiación de longitud de onda λ; $I_{(\lambda)}$ representa la intensidad del sol en la longitud de onda λ; y $A_{(\lambda)}$ es la absorbancia de la solución a la longitud de onda λ. Es importante destacar que para que este método tenga correlación con el método *in-vivo*, la muestra debe ser diluída en etanol hasta obtener una concentración de 0,20 mg mL^{-1}. Por otro lado, la relación entre el efecto eritemogénico y la intensidad de la radiación a cada longitud de onda es una constante determinada por Sayre y col.[129] cómo se describe en la Tabla 2.3.

Tabla 2.3. Constantes para cada longitud de onda (λ) correspondientes al producto entre el efecto eritemogénico y la intensidad de la radiación determinadas por Sayre y col. para el cálculo del FPS in-vitro.

Longitud de onda (nm)	EE(λ) I(λ)
290	0,0150
300	0,0817
305	0,2874
310	0,3278
315	0,1864

[128] Mansur, J. D. S., Breder, M. N. R., Mansur, M. C. D. A., & Azulay, R. D. (1986). Determinação do fator de proteção solar por espectrofotometria. *An. Bras. Dermatol*, 121-4.
[129] Sayre, R. M., Agin, P. P., LeVee, G. J., & Marlowe, E. (1979). A comparison of in vivo and in vitro testing of sunscreening formulas. *Photochemistry and Photobiology*, *29*(3), 559-566.

320	0,0839
Total	**1000**

En esta parte de la tesis se propone la obtención y caracterización fisicoquímica de una nueva microemulsión (o/w) portadora del filtro químico solar BZ3 como potencial PFCP. La estabilidad y eficacia del sistema portador será evaluada mediante diversos estudios analíticos y los resultados serán comparados con formulaciones existentes.

2.3 Parte Experimental

2.3.1 Reactivos y soluciones

Se utilizó agua ultrapura (18 MΩ cm^{-1}) y todos los reactivos utilizados fueron de calidad analítica.

- Benzofenona-3 (Parafarm®, Argentina).
- Etanol absoluto (Dorwil®, Argentina).
- Miristato de isopropilo (Sigma-Aldrich®, Estados Unidos).
- Polisorbato 80 (Sigma-Aldrich®, Estados Unidos).

Las soluciones de trabajo de benzofenona-3 se prepararon mediante la dilución adecuada de una solución madre que contenía 2,000 g de benzofenona-3 en 100 mL de etanol absoluto.

La solución aceptora y el medio no-organizado para la disolución de benzofenona-3 consistieron en una mezcla etanol: agua (1:1).

En la obtención de las microemulsiones se utilizó miristato de isopropilo (MIP) como fase oleosa cuya estructura se muestra en la Figura 2.2. Este aceite presenta aspecto incoloro, es prácticamente inodoro y está compuesto por una mezcla de ésteres de alcohol isopropílico con ácidos grasos saturados de alto peso molecular, principalmente el ácido mirístico. Su fórmula molecular es $C_{17}H_{34}O_2$ y su peso molecular es de 270,51 g mol^{-1}.

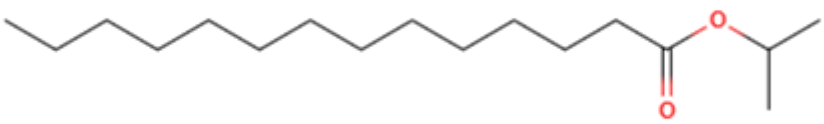


Figura 2.2. Estructura química del miristato de isopropilo (MIP) utilizado como fase oleosa de las microemulsiones propuestas.

Por otro lado, se utilizó como surfactante Polisorbato 80, habitualmente denominado Tween 80 (TW80) cuya estructura puede observarse en la Figura 2.3. Este surfactante no-iónico de fórmula molecular $C_{64}H_{124}O_{26}$ y peso molecular 1309,63 g mol^{-1} posee un HLB de 15.

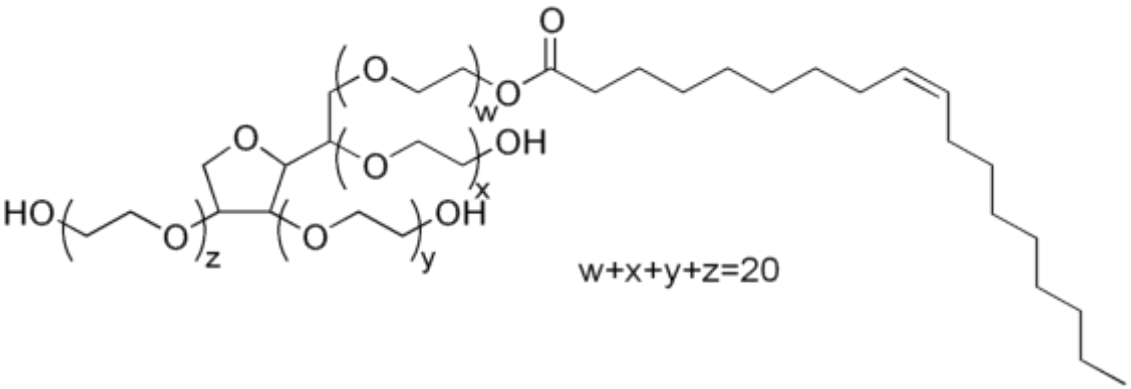


Figura 2.3. Estructura química de Polisorbato 80 o Tween 80 (TW80) utilizado como surfactante no-iónico de las microemulsiones propuestas.

Por otro lado, como co-surfactante se utilizó etanol absoluto (ET) cuya fórmula molecular es C_2H_6O y peso molecular 46,07 g mol^{-1}. A su vez se utilizó este alcohol como medio no-organizado (NO) en diversos estudios.

2.3.2 Comportamiento de fases

La adecuada relación de componentes para la formación de microemulsiones (o/w) se estudió mediante la construcción de diagramas de fases pseudoternarios utilizando el método de titulación acuosa a 25°C. Los diagramas se obtuvieron variando

la concentración de fase oleosa, fase acuosa y de mezcla surfactante:co-surfactante (Smix). Se construyeron tres diagramas, cada uno con una Smix conformada por una relación surfactante:cosurfactante (TW80:ET) diferente: 1:1; 2:1 y 3:1. Para cada diagrama, la relación Smix correspondiente se mezcló con la fase oleosa (MIP) en proporciones (p/p) de 0,5: 9,5; 1: 9; 2: 8; 3: 7; 4: 6; 5: 5; 7: 3 y 8: 2. Posteriormente, cada mezcla de la relación en peso (Smix: MIP) se tituló con agua ultrapura bajo agitación magnética suave. Las microemulsiones se definieron como mezclas transparentes y estables bajo inspección visual, y fueron trazadas en los diagramas donde los ejes representan la fase acuosa, la fase oleosa y la mezcla de surfactante:co-surfactante (Smix) en la relación correspondiente. Por el contrario, si se observó turbidez o separación de fases, las muestras se consideraron bifásicas y, en consecuencia, no fueron trazadas en el diagrama. Las diferentes combinaciones de componentes estudiadas para la obtención de los diagramas de fases pseudoternarios se pueden consultar en el Anexo I. Finalmente, los sistemas considerados microemulsiones (o/w) se almacenaron a temperatura ambiente (25°C) para futuros estudios.

2.3.3 Caracterización fisicoquímica de las microemulsiones

2.3.3.1 Tamaño de gota e índice de polidispersidad

Se realizó una dilución 1:10 de cada muestra en agua ultrapura y el tamaño promedio de gota (Z) y el PdI se determinó mediante DLS utilizando un instrumento marca Malvern® modelo Zetasizer Nanoserie (Malvern, Reino Unido). El software v7.12 proporcionado por Malvern® se utilizó para obtener ambos parámetros utilizando la función de correlación de tiempo. Las funciones de autocorrelación se analizaron por el método de los cumulantes (ajustando un solo exponencial a la función de correlación para obtener el tamaño medio) y el método de distribución (para ajustar un exponencial múltiple a la función de correlación para obtener distribuciones de tamaño de gota). El PdI fue calculado a partir del algoritmo de distribución y se determinaron los valores para cada pico como ancho de pico/diámetro medio. Se midió la dispersión en una celda de borosilicato de 4 mL de calidad óptica en un ángulo de 90°. Todas las mediciones se llevaron a cabo a 25°C.

2.3.3.2 pH, índice de refracción y conductividad eléctrica

Se dispersó un 1,0 g de cada muestra en 10,0 mL de agua ultrapura y se agitó durante 2 h a temperatura ambiente (25°C). Posteriormente, se realizaron las mediciones de pH utilizando un medidor de pH Orion modelo 710 (Beverly, Estados Unidos) y un electrodo Orion-Ross® modelo 81-02. Por otro lado, se utilizó un refractómetro Atago® modelo RX-5000 (Bellevue, Estados Unidos) para la determinación del IR. La CE de las preparaciones se determinó usando un medidor de conductividad Adwa® modelo AD32 (Szeged, Hungría) a 25°C.

2.3.4 Estudios de estabilidad

2.3.4.1 Centrifugación

Para evaluar la estabilidad física de los sistemas, todas las microemulsiones (o/w) obtenidas se centrifugaron a 3000 rpm durante 30 min en una centrífuga Rolco® CM 2036 (Buenos Aires, Argentina). Para ello, se colocaron 10 mL de cada muestra en tubos de centrífuga de vidrio de 10 mL. Al final del experimento se evaluó visualmente la transparencia y la eventual separación de fases.

2.3.4.2 Ciclos de enfriamiento-calentamiento

Las muestras que demostraron ser estables luego del estudio de centrifugación fueron sometidas a cinco ciclos de enfriamiento-calentamiento. Cada ciclo consistió en el almacenamiento de las microemulsiones durante 24 h a 4°C seguido de 24 h a 40°C en una incubadora Hinotek® modelo LRH-70F (Shangai, China). Posteriormente, se procedió a estudiar la estabilidad física de los sistemas monitoreando la ocurrencia de separación de fases y el tamaño de gota de la fase dispersa mediante DLS.

2.3.5 Carga de benzofenona-3 y caracterización fisicoquímica

La carga con el filtro químico solar BZ3 se realizó sobre las microemulsiones (o/w) seleccionadas luego del estudio de estabilidad. Para ello, se disolvió una cantidad apropiada de BZ3 en la fase oleosa (MIP) con agitación magnética suave, de tal manera de obtener sistemas con una concentración final de BZ3 de 2,0% (p/p). Posteriormente las microemulsiones cargadas con BZ3, y denominadas de aquí en adelante BZ3-ME, fueron caracterizadas fisicoquímicamente. En este caso también fueron obtenidos los

parámetros Z y PdI mediante DLS, realizándose además mediciones de Pz utilizando el instrumento marca Malvern® anteriormente descripto, previa filtración de la muestra utilizando un filtro con un tamaño de poro de 0,45 µm. Por otro lado, se determinaron pH, IR y CE siguiendo los procedimientos indicados en la sección 2.3.3.2.

2.3.6 Estudios analíticos

2.3.6.1 Estudio de estabilidad térmica de benzofenona-3

Como se mencionó anteriormente, BZ3 puede ser susceptible a degradación térmica, aunque la información al respecto es limitada en la bibliografía[119,120]. Por ello, se llevó a cabo un estudio analítico de estabilidad térmica del filtro químico solar BZ3 en un medio organizado (BZ3-ME) y se lo comparó con su presencia en un medio no-organizado (BZ3-NO). Los experimentos se realizaron en *batch* y el proceso fue monitoreado mediante espectrometría de fluorescencia molecular. Las muestras (BZ3-ME y BZ3-NO) se incubaron en un baño de agua a 60°C durante 90 min. Se tomaron alícuotas (2,0 mL) en intervalos de 5 min, las cuales fueron analizadas en un espectrofluorímetro marca JASCO®, modelo FP6500 (Easton, Estados Unidos), equipado con una lámpara de descarga de xenón (150W) y empleando una celda de cuarzo de 5 mL. Se utilizó un ancho de ranura de 3 nm para ambos monocromadores (excitación y emisión). La longitud de onda de excitación fue de 290 nm y los espectros de emisión se registraron entre 350 y 690 nm, respectivamente. La velocidad de barrido fue de 1000 nm min^{-1}, y el voltaje del tubo fotomultiplicador fue de 600 V. El intervalo de adquisición y el tiempo de integración se fijaron en 1 nm y 1 s, respectivamente. De esta manera, se obtuvieron un total de 17 espectros por muestra.

2.3.6.2 Estudio de permeación de benzofenona-3 en la microemulsión

Se llevó a cabo un estudio de permeación de BZ3 en la microemulsión (BZ3-ME) utilizando una celda de difusión de Franz de diseño convencional, fabricada en el taller de vitroplastía del Departamento de Química de la Universidad Nacional del Sur (Figura 2.4A). La celda presentó un área efectiva de difusión de 3,14 cm^2 y se empleó una membrana sintética de acetato de celulosa con un tamaño de poro de 0,45 µm, obtenida de filtros comerciales (Whatman®, Reino Unido). Antes de realizar los experimentos, la

membrana se sumergió en la solución aceptora durante 24 h. La membrana fue colocada entre los compartimentos donador y aceptor garantizando un buen sellado y un contacto uniforme que se aseguró a través de una pinza de agarre. El compartimento aceptor fue cargado con solución aceptora manteniendo el sistema a una temperatura constante de (32 ± 1) °C y bajo agitación continua mediante un agitador magnético marca Hanna Instruments modelo HL190 M (Rhode Island, Estados Unidos) a una velocidad de 300 rpm (Figura 2.4B). Entonces, se colocó 0,100 g de la muestra en el compartimento donador y se procedió a realizar extracciones periódicas cada 5 min, tomando 5,0 mL de muestra a través del brazo muestreador y reponiendo igual volumen con solución aceptora para mantener constante el volumen de la celda. La evolución del proceso de permeación fue monitoreado mediante espectroscopía de absorción molecular UV-Vis, utilizando un espectrofotómetro Agilent® modelo 8453 (Waldbronn, Alemania), equipado con una celda de cuarzo de 5 mL de volumen interno y 1 cm de paso óptico. Las mediciones se realizaron a una longitud de onda de 290 nm durante un período de 60 min. La concentración de BZ3 a cada tiempo fue determinada mediante regresión lineal univariada. Para ello, se construyó una curva de calibración con soluciones estándar de BZ3 preparadas en el medio aceptor, en un rango de concentración comprendido entre 0,8 y 8,0 mg L^{-1}.

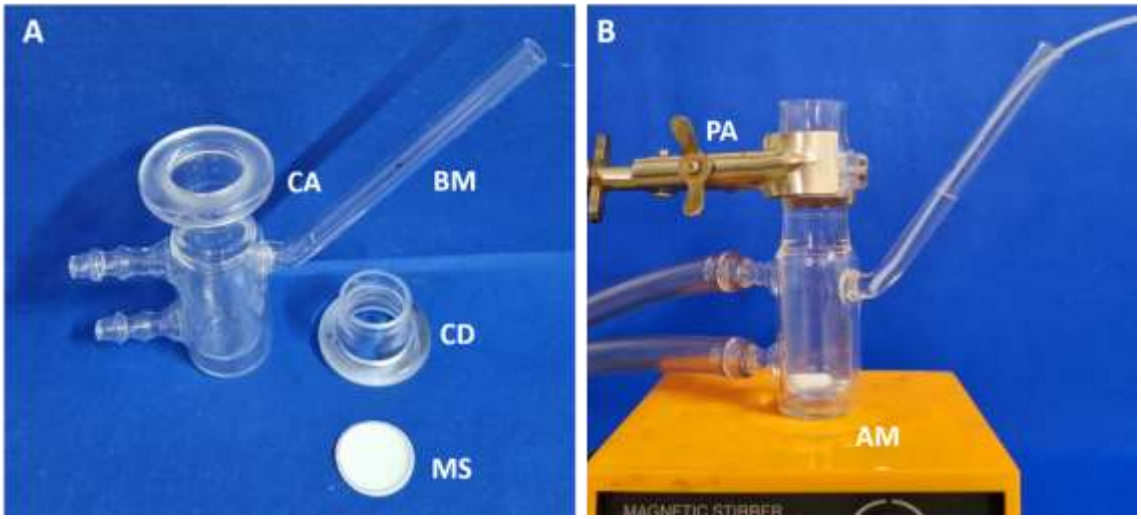


Figura 2.4 Fotografía de la celda de difusión de Franz convencional. A) Componentes del sistema antes del armado. BM: brazo muestreador; CA: compartimento aceptor; CD: compartimento donador; MS: membrana sintética. B) Sistema ensamblado. AM: agitador magnético; PA: pinza de agarre.

2.3.7 Determinación del factor de protección solar *in-vitro*

El FPS fue determinado mediante el método *in-vitro* de Mansur[130]. Para ello, las muestras se diluyeron en etanol absoluto hasta obtener una concentración final de 0,20 mL mL^{-1}. Entonces, se realizaron las mediciones de absorbancia molecular entre 290-320 nm a intervalos de 5 nm, en un espectrofotómetro UV-Vis marca Agilent® modelo 8453 (Waldbronn, Alemania) utilizando una celda de cuarzo de 5 mL con un paso óptico de 1 cm. El cálculo del $FPS_{in\text{-}vitro}$ se realizó aplicando la Ecuación 2.1 y valores de EE e I se obtuvieron de la Tabla 2.2.

2.4 Resultados y discusión

2.4.1 Comportamiento de fases

Los diagramas de fase pseudoternarios exhiben la influencia de los cambios en las fracciones de volumen de las diferentes fases en el comportamiento de fase del sistema y son ampliamente utilizados para obtener las regiones de formación de microemulsiones[131]. La Figura 2.5 muestra los tres diagramas de fases pseudoternarios obtenidos correspondientes a cada relación surfactante:co-surfactante (TW80:ET) estudiada, es decir, 1:1, 2:1 y 3:1. El área de color azul correspondió a sistemas monofásicos que presentaron apariencia transparente lo que indicó la probable formación de microemulsiones.

Se ha demostrado que la longitud y el tamaño de las cadenas laterales hidrofóbicas de los surfactantes determinan, en general, las interacciones con la fase oleosa. La facilidad para disolverse que presenta el MIP en TW80 podría deberse a las similitudes químicas y estructurales entre ambos componentes. Como puede verse en la Figura 2.3, TW80 está conformado por polioxietilenosorbitan (cabeza) y ácido oleico (cola). Esta última es una cadena hidocarbonada (C18) similar a la cadena de carbono del miristato (C17), tal como muestra la Figura 2.2. Es posible que estas cadenas hidrofóbicas sean las responsables de aumentar el perfil de solubilidad del aceite[132]. Por otro lado, ET es

[130] Mansur J. S., Breder M. N. R., Mansur M. C. A., K-124.
[131] Atashafrooz, Z., Maleki Dizaj, S., & Salehi Sadaghiani, A. (2014). Cucurbita pepo oil as a drug microemulsion formulation: study of phase diagram. *Nanomedicine Journal*, *1*(5), 298-301.
[132] Butt, U., ElShaer, A., Snyder, L. A., Al-Kinani, A. A., Le Gresley, A., & Alany, R. G. (2018). Fatty acid based microemulsions to combat ophthalmia neonatorum caused by Neisseria gonorrhoeae and Staphylococcus aureus. *Nanomaterials*, *8*(1), 51.

habitualmente utilizado como co-surfactante en la elaboración de microemulsiones debido a su capacidad de disminuir el efecto hidrofóbico del agua al estar en contacto con el resto de los componentes, ya que altera el orden de las moléculas de agua en la disolución de surfactante[133]. A su vez, es conocido que la concentración de surfactante y co-surfactante puede influir en el tamaño de las gotas y por ende afectar la estabilidad de los sistemas. Como puede verse en las Figuras 2.5A y 2.5C correspondientes a los diagramas de fases obtenidos con una relación surfactante:co-surfactante 1:1 y 3:1, respectivamente, la región de formación de microemulsiones resultó más acotada e irregular con respecto a la región de la Figura 2.5B con una relación surfactante:co-surfactante 2:1. Además, las microemulsiones con dicha relación surfactante:co-surfactante se mostraron más estables en el tiempo, conservando su comportamiento monofásico luego de 24 h, a diferencia de los sistemas obtenidos con una relación surfactante:co-surfactante 1:1 y 3:1.

[133] Forgiarini, A., Pietrangeli, G., Arandia, M., Guédez, V., Celis, M. T., & Márquez, L. (2009). Influencia del tipo de alcohol sobre la formación de nanoemulsiones de aceite de soja-en-agua. *Ciencia e Ingeniería*, *30*(2), 115-120.

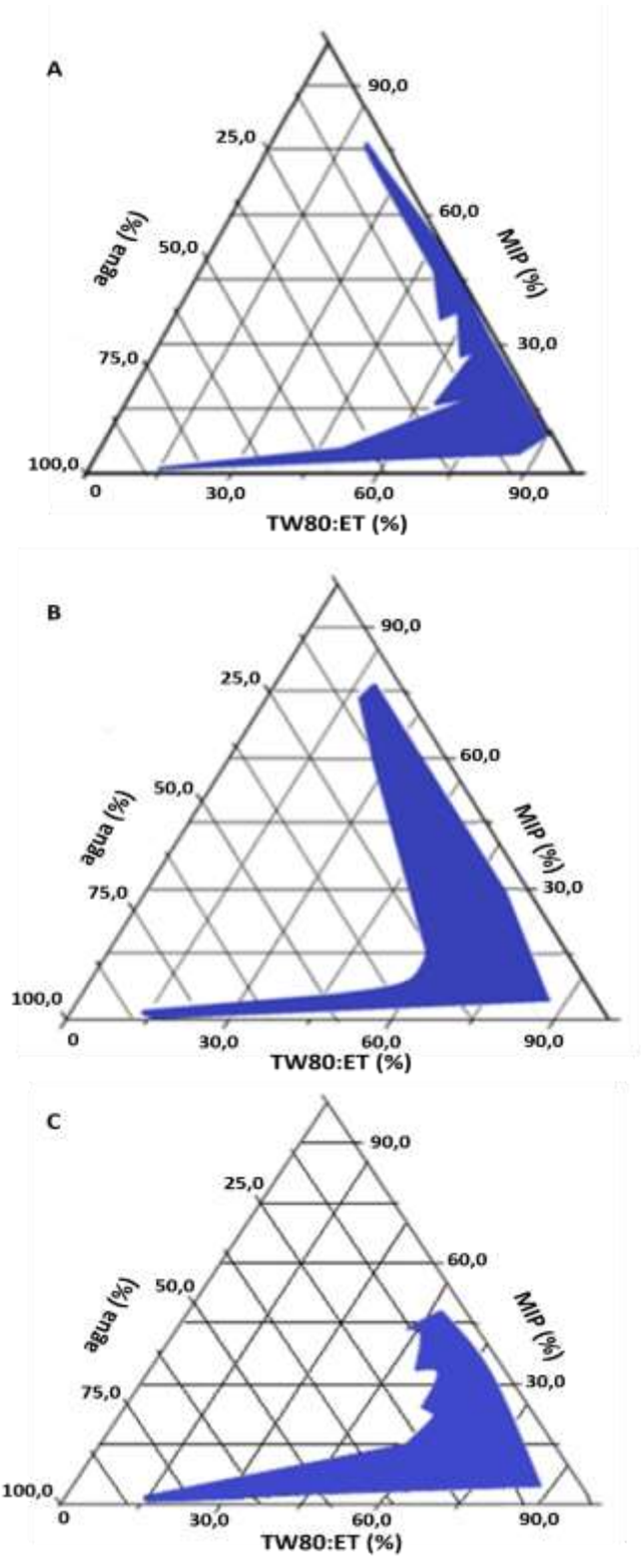


Figura 2.5. Diagramas de fases pseudoternarios obtenidos por la combinación de agua, fase oleosa (MIP) y una mezcla de surfactante:co-surfactante (TW80:ET) en relación: A) 1:1; B) 2:1 y C) 3:1.

Por lo tanto, los sistemas obtenidos con una relación surfactante:co-surfactante 2:1 fueron seleccionados para continuar con los estudios.

A modo de ejemplo, la Figura 2.6A muestra una microemulsión obtenida con una relación Smix (2:1), y la cual se presentó como un sistema transparente y termodinámicamente estable. En contraposición, la Figura. 2.6B muestra un sistema opalescente y termodinámicamente inestable, correspondiente a un punto del diagrama de fases fuera de la región en la que se generan microemulsiones.

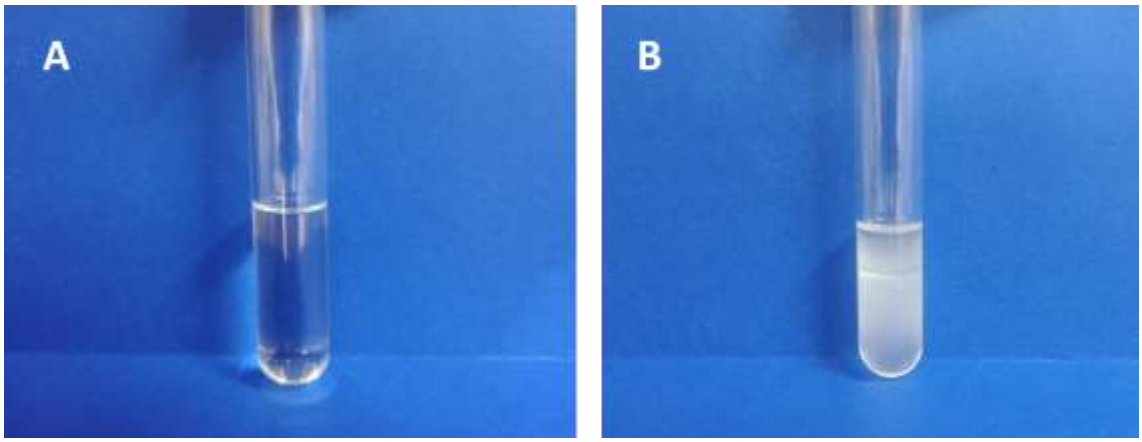


Figura 2.6. Fotografías de mezclas correspondientes al diagrama pseudoternario de fases con una relación surfactante:co-surfactante 2:1. A) Sistema correspondiente a una microemulsión. B) Sistema correspondiente a un punto fuera de la región de formación de microemulsiones.

2.4.2 Caracterización fisicoquímica de las microemulsiones

Considerando como óptima una relación surfactante:co-surfactante 2:1 fueron seleccionados cinco sistemas (ME1 a ME5) dentro de la región de formación de microemulsiones cuya composición puede observarse en la Tabla 2.4.

Tabla 2.4. Composición de las cinco probables microemulsiones seleccionadas con una relación Smix 2:1.

	MIP*	**TW80:ET***	**agua**
ME1	2,00	38,0	60,0
ME2	2,50	42,0	55,5
ME3	2,70	43,0	54,3

ME4	3,00	44,0	53,0
ME5	4,00	45,0	51,0

* Las concentraciones están expresadas en % (p/p)

Entonces, ME1 a ME5 fueron caracterizadas fisicoquímicamente y los resultados se muestran en la Tabla 2.5. Z y PdI son dos parámetros importantes a considerar en el diseño de nuevas formulaciones ya que los mismos están relacionados con la estabilidad y la vida útil del producto. Como puede verse, en todos los casos el tamaño de gota fue menor a 200 nm, valor considerado como límite para el caso de microemulsiones. Sin embargo, ME1 presentó un tamaño de gota mayor al resto de los sistemas (ME2 a ME5), quienes presentaron tamaños similares entre sí. Además, como ya se comentó, el PdI representa la relación entre la desviación estándar y el tamaño medio de gota. Los valores de PdI menores a 0,25 indican una distribución de tamaño estrecha; por el contrario, valores de PdI mayores a 0,50 indican una distribución de tamaño muy amplia. En este caso también ME1 presentó un comportamiento diferente, con un valor de PdI alto (0,857 ± 0,002) lo que indica que se trata de un sistema polidisperso. En el caso de ME2 a ME5 los valores de PdI fueron más bajos (< 0,25) indicando sistemas monodispersos y potencialmente estables debido a la uniformidad en el tamaño de gotas.

En cuanto al pH, todas las muestras (ME1 a ME5) exhibieron valores en el rango de 5,53 a 6,07, lo cual es deseable para una aplicación de uso tópico ya que este rango es compatible con el pH normal de la piel[134].

Por otro lado, el IR de las muestras estuvo en el rango de 1,3852 a 1,3896 indicando que son valores típicos para microemulsiones que están conformadas por agua, ésteres, surfactantes no-iónicos y co-surfactantes alcohólicos[135]. Además, se pudo observar que la CE de los sistemas analizados estuvo en el rango de 0,010 a 0,030 mS

[134] Proksch, E. (2018). pH in nature, humans and skin. *The Journal of dermatology*, *45*(9), 1044-1052.

[135] Racovita, R. C., Ciuca, M. D., Catana, D., Comanescu, C., & Ciocirlan, O. (2023). Microemulsions of nonionic surfactant with water and various homologous esters: Preparation, phase transitions, physical property measurements, and application for extraction of tricyclic antidepressant drugs from aqueous media. *Nanomaterials*, *13*(16), 2311.

cm^{-1}, en concordancia con los valores esperados para microemulsiones de tipo aceite en agua (o/w)[136].

Con estos resultados podemos confirmar que los sistemas estudiados (ME1 a ME5) corresponden a microemulsiones de tipo aceite en agua (o/w) y que los mismos presentan un pH biocompatible para su uso en piel.

Tabla 2.5. Caracterización fisicoquímica de los sistemas seleccionados (ME1 a ME5) con una relación surfactante:cosurfactante (TW80:ET) 2:1. Todas las determinaciones fueron realizadas por triplicado (n=3).

	Z (nm)	**PdI**	**pH**	**IR**	**CE (mS cm^{-1})**
ME1	24,95±0,09	0,857±0,002	5,53±0,01	1,3860±0,0014	0,030±0,001
ME2	11,20±0,01	0,194±0,015	6,07±0,01	1,3896±0,0021	0,030±0,001
ME3	12,30±0,10	0,246±0,025	5,56±0,01	1,3852±0,0017	0,030±0,001
ME4	11,80±0,50	0,201±0,010	5,71±0,01	1,3886±0,0020	0,030±0,001
ME5	12,93±0,10	0,237±0,030	5,69±0,01	1,3887±0,0016	0,010±0,002

2.4.3 Estudio de estabilidad de las microemulsiones

Como se detalló en la sección 2.3.4, las muestras fueron sometidas a un proceso de centrifugación al final del cual las mismas permanecieron transparentes y sin evidencia de turbidez y/o separación de fases. Por ello, ME1 a ME5 se expusieron a ciclos de frío-calor a fin de evaluar su estabilidad bajo dichas condiciones. Como puede verse en la Tabla 2.6, ME4 mostró cambios en su apariencia luego del test evidenciando una notable turbidez. En cuanto al tamaño de gota (Z) no se observaron diferencias estadísticamente significativas (p = 0,05) para ME2, ME3 y ME5. Sin embargo, resultó significativa la

[136] Gunaseelan, K., Umlong, I. M., Mukhim, T., & Ismail, K. (2003). Electrical conductance behavior of oil-in-water microemulsions stabilized by sodium dodecyl sulfate and 1-butanol. *Langmuir*, *19*(18), 7276-7281.

diferencia para ME1, en la cual disminuyó el valor Z, y para ME4 en la cual, por el contrario, el tamaño de gota aumentó considerablemente después de la prueba de estabilidad. En cuanto al PdI, este valor disminuyó significativamente en ME1, llegando al rango que corresponde a un sistema monodisperso. La centrifugación puede inducir separación de fases o compactación de gotas si la fuerza aplicada supera la estabilidad coloidal del sistema. Sin embargo, si está bien controlada, puede eliminar agregados o fases inestables, favoreciendo una distribución más uniforme y compatible con un sistema monodisperso[137]. Adicionalmente, cambios de temperatura pueden alterar el equilibrio entre las fases. Un aumento moderado puede mejorar la solubilidad de los componentes y reducir la viscosidad, favoreciendo reordenamientos hacia sistemas más estables[138,139]. En el caso de ME3 y ME4 se registró un aumento significativo en los valores de PdI evidenciando cierto grado de polidispersidad luego del estudio de estabilidad ($p < 0,05$). Por el contrario, los valores de PdI de ME2 y ME5 no mostraron diferencias estadísticamente significativas ($p = 0,05$) luego del estudio. Dado que ME2 contiene una menor concentración de surfactante, lo cual es ventajoso en formulaciones de uso tópico, está microemulsión fue la seleccionada para continuar con los estudios de carga.

Tabla 2.6. Resultados del estudio de estabilidad basado en centrifugación y ciclos frío-calor llevado a cabo para las microemulsiones seleccionadas (ME1-ME5). Todas las determinaciones fueron realizadas por triplicado (n=3).

	Antes del test			**Después del test**		
	Z	**PdI**	**Aspecto**	**Z**	**PdI**	**Aspecto**
ME1	24,95±0,09	0,857±0,002	C,T	11,45±0,04	0,217±0,007	C,T

[137] Liu, H. S., Chen, K. A., & Tai, C. Y. (2012). Droplet stability and product quality in the Higee-assisted microemulsion process for preparing CaCO3 particles. *Chemical Engineering Journal*, *197*, 101-109.
[138] Dongqi, W., Daiyin, Y., Junda, W., Yazhou, Z., & Chengli, Z. (2022). Influencing factors and microscopic formation mechanism of phase transitions of microemulsion system. *Journal of Petroleum Exploration and Production Technology*, *12*(10), 2735-2746.
[139] Ashikhmin, A., Andropov, M., Piskunov, M., Strizhak, P., & Yanovsky, V. (2023). Effects of temperature on viscosity, stability, and microstructure of water-in-biodiesel microemulsions. *Journal of Dispersion Science and Technology*, *44*(6), 987-999.

ME2	11,20±0,01	0,194±0,015	C,T	13,12±0,09	0,178±0,015	C,T
ME3	12,30±0,10	0,246±0,025	C,T	16,04±0,03	0,361±0,035	C,T
ME4	11,80±0,50	0,201±0,010	C,T	122,30±4,66	0,345±0,003	Tu,L
ME5	12,93±0,10	0,237±0,030	C,T	10,63±0,04	0,212±0,003	C,T

C: claro; L: lechoso; T: transparente; Tu: turbio

2.4.4 Carga de benzofenona-3 y caracterización fisicoquímica

El filtro solar BZ3 pudo cargarse exitosamente en la fase oleosa de ME2 en una concentración final del 2,0% (p/p), obteniendo un sistema transparente y estable. Los resultados de la caracterización fisicoquímica mostraron que BZ3-ME presenta un tamaño de gota de (11,90 ± 0,93) nm levemente superior a la microemulsión sin carga (ME2 = 11,20 ± 0,01) lo que resulta esperable debido a la incorporación del filtro solar. Con respecto al PdI, BZ3-ME presentó un valor de (0,224 ± 0,017) el cual fue levemente superior a ME2 (0,194 ± 0,015). Sin embargo, dicho valor continúa correspondiendo a un sistema monodisperso (<0,25) lo que indica que la muestra presenta un tamaño de gota uniforme (Figura 2.7A). Por otro lado, BZ3-ME presentó un valor de Pz de (-9,05 ± 0,01) tal como se muestra en la Figura 2.7B, y esto probablemente se deba al uso de Tween 80, ya que a pesar de ser un surfactante no-iónico, este suele exhibir carga negativa al poseer en su estructura una cadena de polioxietileno capaz de generar cargas parciales inducidas por la diferencia de electronegatividad entre el carbono y el oxígeno que están presentes en el oxietileno[140].

Además, el valor de IR fue de (1,3350 ± 0,0002) y la CE de (0,065 ± 0,010) mS cm^{-1} confirmando que se trata de un sistema isotrópico y de tipo (o/w), respectivamente.

[140] Suna, P., & Misra, P. K. (2018). Effect of ionic and nonionic surfactants on the phase behaviour and physicochemical characteristics of pseudoternary systems involving polyoxyethylene (20) sorbitan monooleate. *Surfaces and Interfaces, 10*, 19-26.

Finalmente, el pH de BZ3-ME fue 5,50 ± 0,03 sugiriendo que la formulación propuesta continúa siendo apta para uso tópico.

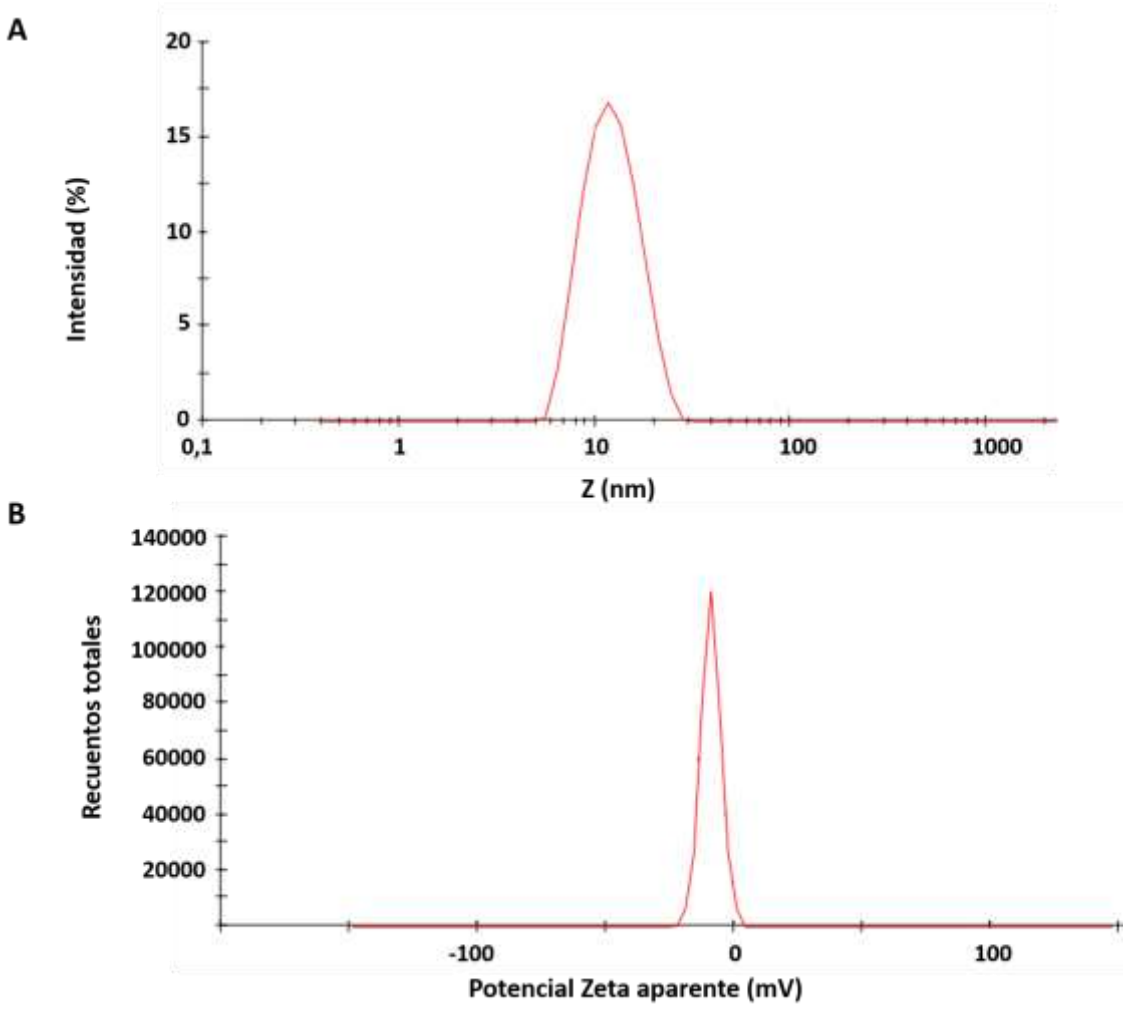


Figura 2.7. A) Gráfico de la distribución del tamaño de gota de BZ3-ME obtenida por DLS. B) Gráfico del barrido de potencial de BZ3-ME.

2.4.5 Estudios analíticos

2.4.5.1 Estudio de estabilidad térmica de benzofenona-3 cargada en la microemulsión

La estabilidad de los filtros químicos solares es un aspecto crucial para garantizar tanto su eficacia fotoprotectora como su seguridad, ya que muchos de estos compuestos pueden generar productos de degradación que disminuyen su eficacia o ser potencialmente tóxicos bajo determinadas condiciones. Por ejemplo, se ha demostrado que el octil p-metoxicinamato, un filtro orgánico muy utilizado en productos comerciales,

es fotosensible y presenta una disminución en la eficiencia de absorción de rayos UV tras la exposición a la radiación solar[93]. Por otro lado, se han asociado casos de reacciones alérgicas debido a productos de fotodegradación (arilglioxales y bencilos) de la avobenzona[141]. Por lo tanto, resulta de interés que los sistemas portadores de BZ3 protejan a este compuesto de la degradación térmica, ya que muchos de estos productos se almacenan o utilizan en condiciones de alta temperatura, alcanzadas en la mayoría de los casos por exposición directa al sol. Por ello, se realizó un estudio de estabilidad térmica de BZ3 con el que se determinó el posible efecto protector que ejerce el sistema portador propuesto (ME2) sobre BZ3 cuando el mismo es sometido a una temperatura de 60°C durante distintos períodos de tiempo. En la Figura 2.8 se muestran los espectros de fluorescencia molecular entre 350-690 nm de BZ3 luego de la incubación a 60°C durante el tiempo estudiado (0 a 90 min) cuando el mismo se encuentra en un medio no-organizado (BZ3-NO) respecto a cuando el mismo se encuentra cargado en la ME2 (BZ3-ME). Como puede observarse, la intensidad de la señal fluorescente de BZ3 disminuyó a lo largo del tiempo en el caso de BZ3-NO evidenciando un posible proceso de degradación de BZ3. Sin embargo, en el caso de BZ3-ME la fluorescencia permaneció relativamente constante a lo largo del tiempo estudiado.

[141] Afonso, S., Horita, K., e Silva, J. S., Almeida, I. F., Amaral, M. H., Lobão, P. A., ... & Lobo, J. S. (2014). Photodegradation of avobenzone: Stabilization effect of antioxidants. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, *140*, 36-40.

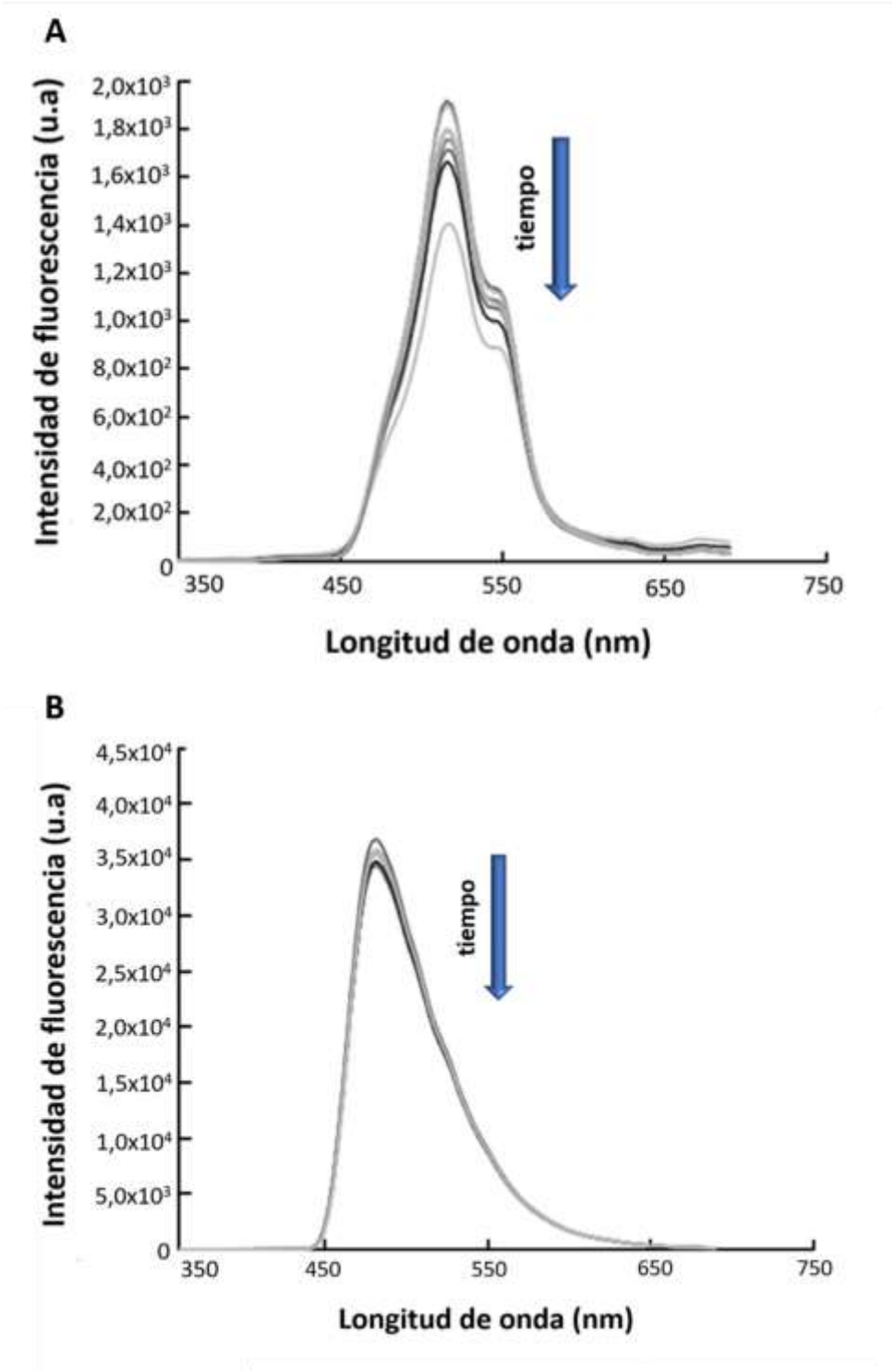


Figura 2.8. Espectros de fluorescencia molecular obtenidos durante el proceso de termodegradación a 60°C y durante 90 min. A) BZ3-NO y B) BZ3-ME.

A partir de los datos espectrales recolectados se obtuvieron los perfiles de concentración correspondientes a BZ3-NO y BZ3-ME, los cuales se muestran en la Figura 2.9A y 2.9B, respectivamente. Como puede observarse, el perfil de BZ3-NO puede

interpretarse como una disminución en la concentración de BZ3 a lo largo del tiempo de análisis mientras que el perfil de BZ3-ME podría asumirse que se mantuvo sin cambios bajo las condiciones de estudio.

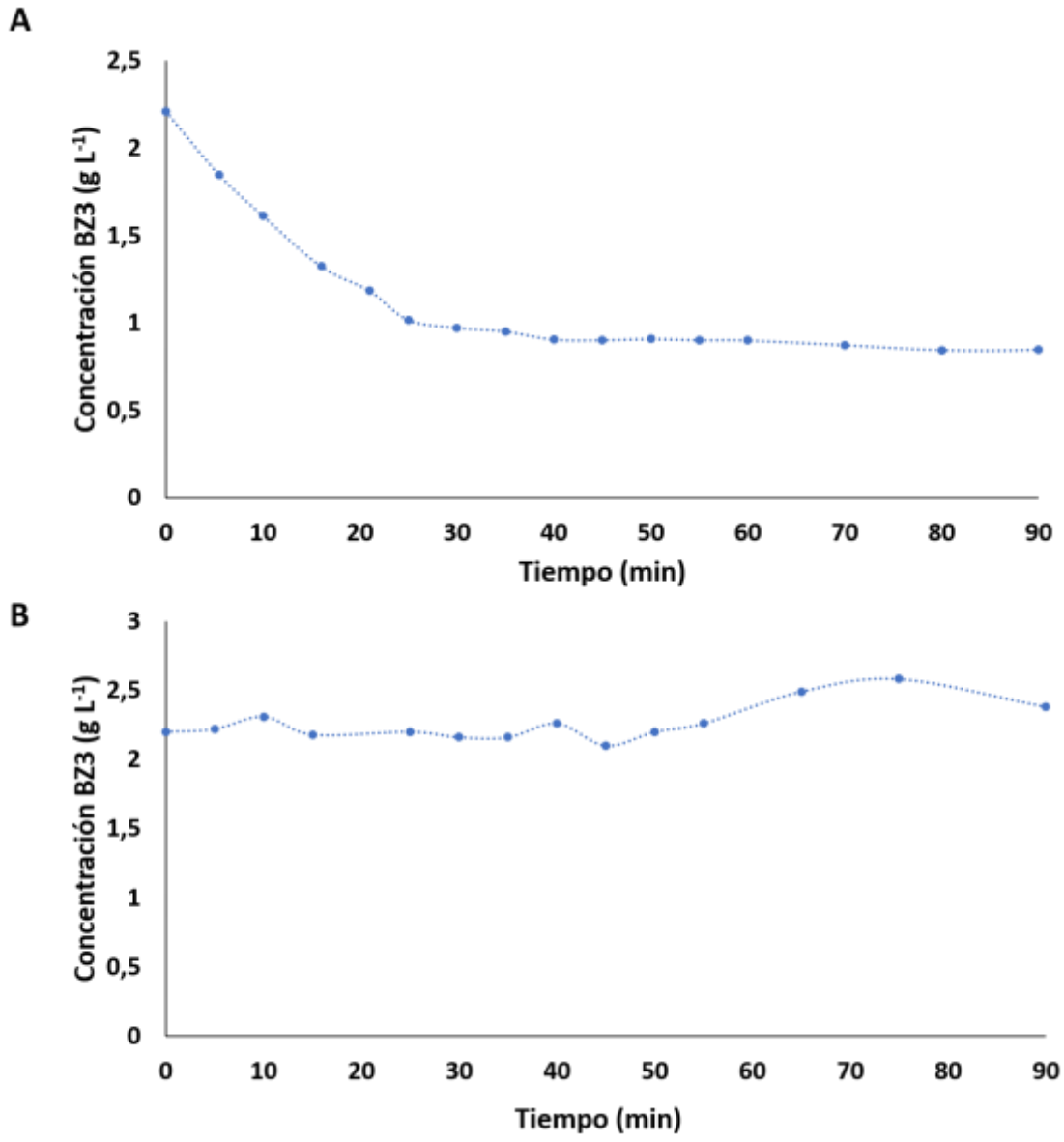


Figura 2.9. Perfiles de concentración correspondientes a la termodegradación a 60°C de BZ3 durante 90 min cuando se encuentra en: A) un medio no-organizado (BZ3-NO) y B) ME2 (BZ3-ME). Los puntos representan el valor promedio de tres determinaciones (n=3).

La constante cinética de termodegradación (*Kt*) de BZ3-NO se calculó utilizando su correspondiente perfil de concentración (Figura 2.9A). Como puede verse en la Figura

2.10, la disminución de la concentración de BZ3 en un medio no-organizado en función del tiempo se ajustó a una cinética de primer orden, según:

$$\ln \frac{[(Ct - Cinf)}{[(C0 - Cinf)]} = Kt \qquad \text{Ecuación 2.2}$$

donde *Ct* es la concentración de BZ3 en el tiempo *t*, *Cinf* es la concentración de BZ3 a tiempo infinito, C_0 es la concentración inicial de BZ3, *t* es el tiempo de termodegradación en minutos, y *k* es la constante cinética.

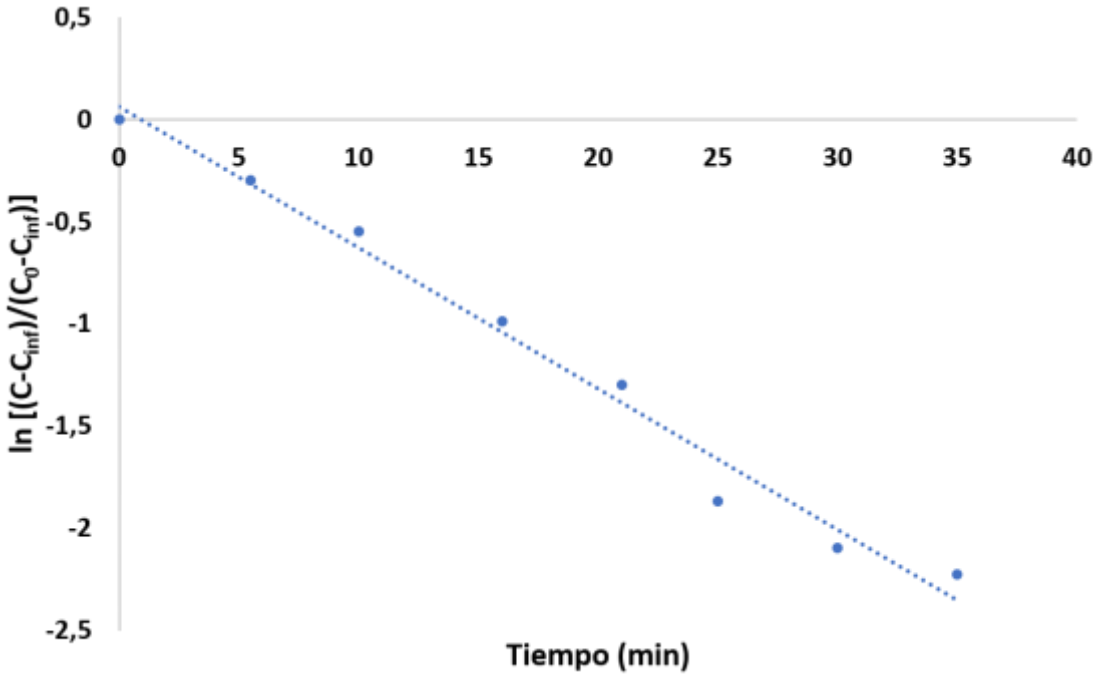


Figura 2.10 Curva de termodegradación de BZ3 en un medio no-organizado (BZ3-NO) obtenida ajustando los datos a un modelo de cinética de primer orden. Los puntos representan el valor promedio de tres determinaciones (n=3).

El modelo presentó un óptimo ajuste (R^2 = 0,9827) y a partir del mismo se obtuvo una constante de termodegradación (*Kt*) para BZ3-NO de (0,069 ± 0,001) min^{-1}. En el caso de BZ3-ME no fue posible calcular la correspondiente constante ya que no se registraron cambios en la concentración de BZ3 a lo largo del tiempo. Esto indicaría que cuando BZ3 se encuentra en un medio no-organizado sufre degradación térmica mientras que cuando se encuentra cargado en la ME propuesta su degradación está limitada, lo que

sugiere que el sistema portador protege de cierta manera al filtro químico solar de la degradación inducida por la temperatura, en las condiciones estudiadas.

2.4.5.2 Estudio de permeación de de benzofenona-3 cargada en la microemulsión

En la actualidad, la aplicación tópica del filtro solar BZ3 ha sido motivo de preocupación debido a su capacidad de absorberse a través de la piel y alcanzar la circulación sistémica. Diversos estudios han reportado su detección en sangre, orina y leche materna tras la exposición dérmica[142,143,144] lo cual ha motivado investigaciones sobre sus posibles efectos adversos. Entre ellos se mencionan potenciales efectos endocrinos[145], estrés oxidativo[146], reacciones alérgicas[147] y fototoxicidad en pieles sensibles[148]. A pesar de ello, y como ya se ha mencionado, nuestro país continúa aprobando su uso mientras no se superen los límites de concentración establecidos, ya que los beneficios en términos de fotoprotección pueden superar los riesgos cuando se utiliza de forma adecuada. Por todo esto, la evaluación de nuevas formulaciones, como sistemas portadores que reduzcan su permeación cutánea, resulta crucial para mejorar su perfil de seguridad.

---

[142] Zhang, T., Sun, H., Qin, X., Wu, Q., Zhang, Y., Ma, J., & Kannan, K. (2013). Benzophenone-type UV filters in urine and blood from children, adults, and pregnant women in China: partitioning between blood and urine as well as maternal and fetal cord blood. *Science of the Total Environment*, *461*, 49-55.

[143] Pollack, A. Z., Mumford, S. L., Krall, J. R., Carmichael, A. E., Sjaarda, L. A., Perkins, N. J., ... & Schisterman, E. F. (2018). Exposure to bisphenol A, chlorophenols, benzophenones, and parabens in relation to reproductive hormones in healthy women: a chemical mixture approach. *Environment international*, *120*, 137-144.

[144] Schlumpf, M., Kypke, K., Wittassek, M., Angerer, J., Mascher, H., Mascher, D., ... & Lichtensteiger, W. (2010). Exposure patterns of UV filters, fragrances, parabens, phthalates, organochlor pesticides, PBDEs, and PCBs in human milk: correlation of UV filters with use of cosmetics. *Chemosphere*, *81*(10), 1171-1183.

[145] Wnuk, W., Michalska, K., Krupa, A., & Pawlak, K. (2022). Benzophenone-3, a chemical UV-filter in cosmetics: is it really safe for children and pregnant women? *Advances in Dermatology and Allergology/Postępy Dermatologii i Alergologii*, *39*(1), 26-33.

[146] Moreira, A. L. P., Paiva, W. S., de Souza, A. M., Pereira, M. C. G., Rocha, H. A. O., de Medeiros, S. R. B., & Luchiari, A. C. (2023). Benzophenone-3 causes oxidative stress in the brain and impairs aversive memory in adult zebrafish. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, *100*, 104164.

[147] Gao, L., Yuan, T., Zhou, C., Cheng, P., Bai, Q., Ao, J., ... & Zhang, H. (2013). Effects of four commonly used UV filters on the growth, cell viability and oxidative stress responses of the Tetrahymena thermophila. *Chemosphere*, *93*(10), 2507-2513.

[148] Kim, H. J., Lee, E., Lee, M., Ahn, S., Kim, J., Liu, J., ... & Noh, M. (2018). Phosphodiesterase 4B plays a role in benzophenone-3-induced phototoxicity in normal human keratinocytes. *Toxicology and applied pharmacology*, *338*, 174-181.

Para abordar el estudio de permeación mediante detección por espectrometría de absorción molecular UV-Vis en primer lugar se evaluó el comportamiento espectral de BZ3, el sistema portador (ME2) y BZ3-ME. En la Figura 2.11A se presentan los espectros de una solución estándar (2,0 mg L^{-1}) de BZ3 (línea azul), ME2 (línea naranja) y BZ3-ME (línea gris), respectivamente. Como puede observarse, BZ3 presenta tres máximos de absorción (242, 288 y 330 nm), ME2 un máximo a 234 nm y BZ3-ME tres máximos (238, 288 y 328 nm). Dado que ME2 no presenta absorbancia en torno a los 290 nm, y allí BZ3 presenta la máxima absorbancia, se seleccionó esta longitud de onda para la cuantificación de BZ3 mediante regresión lineal univariada. Para la serie de testigos analizados, la ecuación de la recta de calibración obtenida fue A = 0,2554 [BZ3 Lmg^{-1}] c + 0,0276 (Figura 2.11B). El coeficiente de determinación (R^2) obtenido fue de 0,9910.

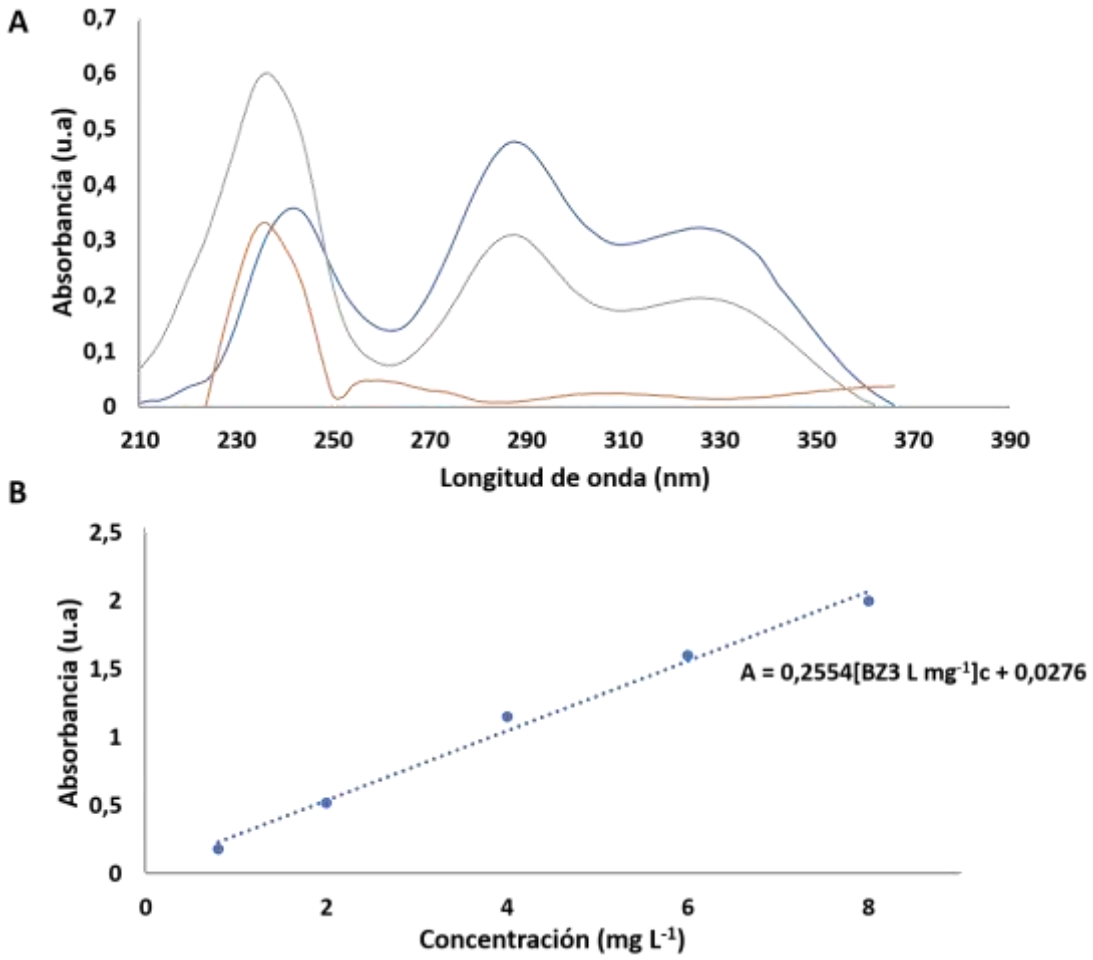


Figura 2.11. A) Espectros de absorción molecular de BZ3 (línea azul), ME2 (línea naranja) y BZ3-ME (línea gris). B) Curva de calibrado de BZ3 en un rango de concentración entre 0,8-8,0 mg L^{-1}. Los puntos representan el valor promedio de tres determinaciones (n=3).

A partir de esta recta de calibración se calcularon las concentraciones de BZ3 en la solución aceptora a lo largo del proceso de permeación.

Como ya se ha mencionado, la concentración de BZ3 en BZ3-ME fue de 2,0% (p/p). Una vez iniciado el proceso de permeación, BZ3 difundió hacia la solución aceptora a través de la membrana de acetato de celulosa. El proceso de permeación de BZ3 se registró durante 60 min y los resultados se muestran en la Figura 2.12. Como puede observarse, la concentración acumulada de BZ3 por unidad de área se relacionó linealmente con el tiempo de permeación. La ecuación de ajuste para el modelo lineal fue $c = 0{,}0613\ [h^{-1}]\ t + 0{,}0053\ [mg\ cm^{-2}]$, la cual presentó un coeficiente de determinación (R^2) de 0,9795, indicando una fuerte correlación entre ambas variables.

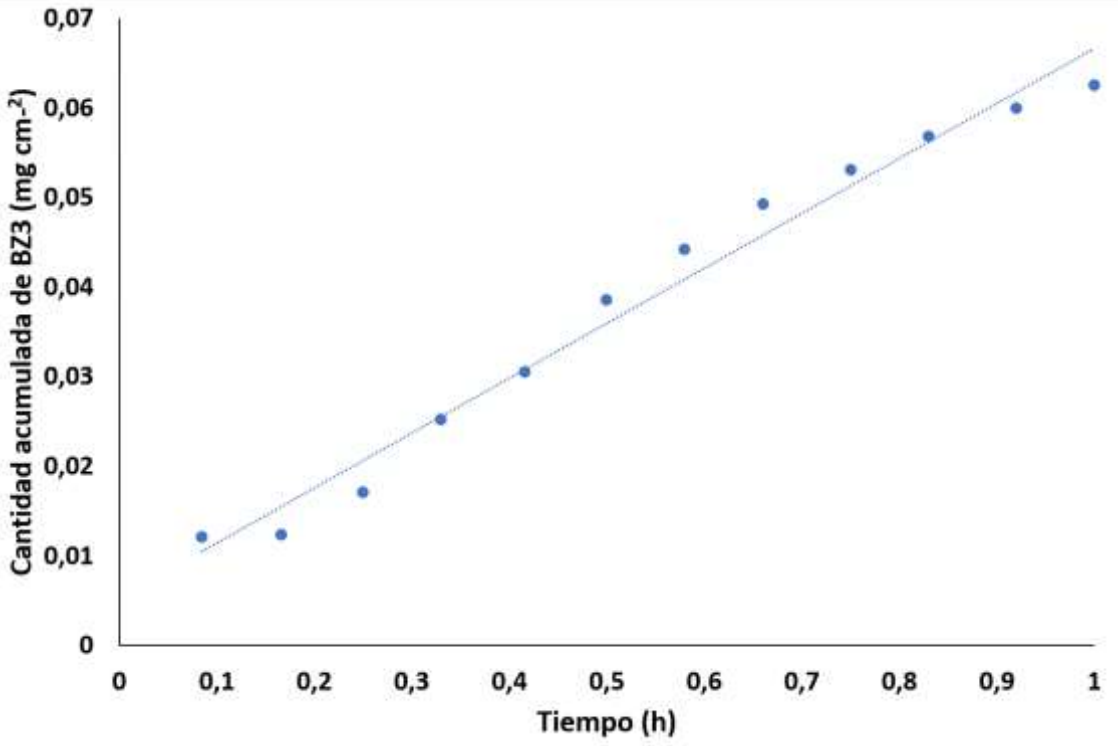


Figura 2.12 Perfil de permeación representado como cantidad de BZ3 acumulada por unidad de área (cm^2) en función del tiempo cuando BZ3 se encuentra cargado en ME2. Los puntos representan el valor promedio de tres determinaciones (n=3).

Entonces, a partir del perfil de permeación de BZ3 se calculó la correspondiente constante de permeación *Kp* utilizando la Ecuación 2.1:

$$Kp = \frac{J}{Cd} \qquad \text{Ecuación 2. 1}$$

donde *J* es el flujo de permeación (mg cm^{-2} h^{-1}) y *Cd* es la concentración en el compartimento donador en mg cm^{-3}. De esta manera, el valor de *Kp* obtenido para BZ3 cargado en ME2 fue de 3,06 x 10^{-3} ± 4,0 x 10^{-7} cm h^{-1}.

Estudios previos han evaluado la permeación de BZ3 en distintos sistemas portadores incluyendo formulaciones comerciales[149,150]. En la Tabla 2.7 se detalla la composición de los sistemas analizados, incluyendo el tipo de membrana empleado, con sus correspondientes valores de *Kp*.

Tabla 2.7. Constantes de permeación de BZ3 obtenidas en distintos trabajos publicados en la literatura cuando se encuentra cargada en diferentes sistemas portadores.

Sistema portador	**BZ3 % (p/p)**	**Membrana**	***Kp* (cm h^{-1})**	**Referencia**
Parafina líquida	2,0	Piel humana	2,30 × 10^{-3}	
		PEAD	2,70 × 10^{-3}	
Aceite de coco	2,0	Piel humana	4,10 ×10^{-4}	Benson y col.[154]
		PEAD	4,73 × 10^{-4}	
Etanol: Aceite de coco (1:1)	2,0	Piel humana	2,00 × 10^{-3}	
		PEAD	6,30 × 10^{-4}	

[149] Benson, H. A., Sarveiya, V., Risk, S., & Roberts, M. S. (2005). Influence of anatomical site and topical formulation on skin penetration of sunscreens. *Therapeutics and Clinical Risk Management*, *1*(3), 209-218.

[150] Jung, W., Seok, S. H., Shin, S., Ryu, S. H., Kim, K. B., Shin, B. S., & Kim, T. H. (2022). Toxicokinetics, Percutaneous Absorption and Tissue Distribution of Benzophenone-3, an UV Filtering Agent, in Rats. *Toxics*, *10*(11), 672.

Crema acuosa	2,0	Piel humana	$1,20 \times 10^{-3}$	
		PEAD	$7,10 \times 10^{-4}$	
Crema oleosa	2,0	Piel humana	$1,65 \times 10^{-3}$	
		PEAD	$2,10 \times 10^{-4}$	
Vaselina	5,0	Piel de rata	n.d	
Mezcla de Aceites*	5,0	Piel de rata	n.d	Jung y col.[155]
Loción**	5,0	Piel de rata	n.d	
Gel***	5,0	Piel de rata	n.d	
BZ3-ME	**2,0**	**Acetato de celulosa**	**$3,06 \times 10^{-3}$**	**Este trabajo**

AC: acetato de celulosa; J: flujo; *Kp*: constante de permeabilidad; MPAD: membrana de polietileno de alta densidad; * Miglyol (18,7%) - Aceite mineral (72,3%) - Cera de abejas (4,0%); ** Miglyol (18,7%) - Emulsión corporal comercializada (75,8%) - Surfactante (0,5%); *** Miglyol (18,7 %) - Carbomer 940 (1,1 %) - Poloxámero 188 (0,2 %) - EDTANa (0,1 %) - Metilparabeno (0,1 %) - NaOH (10,0 %) - Surfactante (0,5 %) - Agua destilada (64,3 %).

A pesar de las diferencias metodológicas entre estudios, principalmente relacionadas con el tipo de membrana utilizada, las condiciones experimentales y los sistemas portadores utilizados, podemos analizar y comparar el comportamiento de BZ3 en su sistema portador. En nuestro trabajo, BZ3 presentó un valor de *Kp* con un orden de magnitud similar a los reportados por otros autores. Sin embargo, aunque se requieren

ensayos complementarios para validar estos resultados en condiciones más cercanas al uso clínico o cosmético, los datos obtenidos podrían sugerir que la formulación propuesta ofrece un perfil de permeación adecuado para BZ3, limitando potencialmente su absorción sistémica y disminuyendo el riesgo de probables efectos secundarios inherentes a su uso.

2.4.6 Factor de protección solar *in-vitro*

El $FPS_{in\text{-}vitro}$ fue calculado para evaluar la eficacia de BZ3-ME como protector solar. Cabe recordar que ME2 no presentó absorción de radiación en el rango de longitudes de onda analizado por el método (290 -320 nm), por lo que se deduce que no contribuiría a mejorar el factor de protección de la formulación (Figura 2.11A). El $FPS_{in\text{-}vitro}$ calculado para BZ3-ME fue 2,0 un valor esperable dada la concentración de filtro químico utilizado, y a que fue el único filtro cargado en ME2. Es importante tener en cuenta que, como ya se ha mencionado, la mayoría de las formulaciones comerciales contienen una combinación de varios filtros químicos solares (Tabla 2.2). Además, en dichos casos el FPS declarado corresponde al $FPS_{in\text{-}vivo}$, el cual es el que debe obtenerse para poder certificar un producto y puede diferir del valor de $FPS_{in\text{-}vitro}$[151].

2.5 Conclusiones parciales

Se logró desarrollar un sistema nanoestructurado del tipo microemulsión (o/w) cargado con el filtro químico solar benzofenona-3 para su potencial uso como producto de protección solar. La construcción de diagramas de fases pseudoternarios permitieron encontrar la combinación óptima de componentes para formar una microemulsión adecuada para la carga de benzofenona-3, la cual se obtuvo de manera sencilla, rápida y utilizando un método de baja energía. Los resultados de la caracterización fisicoquímica demostraron que el sistema disperso cargado con el filtro solar presentó un tamaño de gota uniforme en la escala nanométrica, un valor de potencial zeta compatible con sistemas estables, y un valor de pH adecuado para la aplicación tópica, entre otros. Por otro lado, se pudo demostrar que el sistema portador propuesto disminuyó la cinética de termodegradación de benzofenona-3, bajo las condiciones estudiadas, y en comparación

[151] ISO. EN ISO 24444:2010 Cosmetics – Sun protection test methods. In vivo determination of the sun protection factor (SPF). 2010.

con el filtro solar en un medio no-organizado. Este hecho es de gran importancia si consideramos que la eficacia de una formulación puede disminuir si el filtro solar se degrada térmicamente, y esto puede verse favorecido por las condiciones en las cuales se conservan este tipo de productos, o bien a las condiciones a las cuales están expuestos cuando son aplicados en la piel. En cuanto a la cinética de permeación, benzofenona-3 cargada en la microemulsión propuesta presentó un valor de la constante de permeación comparable con el filtro cargado en otros sistemas portadores reportados en la literatura. Este resultado fue relevante ya que la cinética de permeación del filtro solar influye en la eficacia del producto a lo largo del tiempo una vez aplicado, y en la posible acción de efectos secundarios ocasionados por alcanzar la circulación sistémica. Por último, el factor de protección solar *in-vitro* calculado fue óptimo considerando el porcentaje de carga en el sistema portador y teniendo en cuenta que se incorporó un único filtro solar en el mismo.

Capítulo 3

Desarrollo de una microemulsión portadora de ciprofloxacina para el tratamiento tópico de infecciones causadas por *Staphylococcus aureus*

3.1 Objetivos

Desarrollar una microemulsión (o/w) portadora del antibiótico de amplio espectro ciprofloxacina para un potencial uso tópico e intranasal de infecciones causadas por el patógeno oportunista *Staphylococcus aureus*, a partir de materiales biocompatibles y aceptados por la normativa vigente para uso farmacéutico. Obtener y caracterizar fisicoquímicamente la microemulsión propuesta, llevar a cabo estudios analíticos para evaluar la permeación del mismo utilizando un sistema automático en línea, y abordar estudios *in-vitro* e *in-vivo* para determinar su actividad antimicrobiana como potencial indicador de su eficacia terapéutica.

3.2 Introducción

Staphylococcus aureus (*S. aureus*) es una especie bacteriana oportunista omnipresente que puede infectar, replicarse y persistir en huéspedes vertebrados. Aunque *S. aureus* puede colonizar las superficies mucosas de los seres humanos sanos con características clínicas leves o imperceptibles, tiene el potencial invasivo de generar diversas infecciones que pueden comprometer la vida, lo que convierte a esta especie en una amenaza mundial para la salud pública[152,153]. Además de la incidencia generalizada de *S. aureus* resistente a la meticilina (MRSA, del inglés *methicillin-resistant Staphylococcus aureus*), una cepa bacteriana que es resistente a la mayoría de los antibióticos habituales[154], el control de la infección se ve obstaculizado por la evolución de *S. aureus* con una susceptibilidad reducida a la vancomicina, el fármaco de elección para el tratamiento de las infecciones por MRSA[155]. Para agravar aún más el problema, mientras que inicialmente MRSA se limitó principalmente a entornos de atención médica[156], la epidemiología de MRSA ha cambiado en los últimos años con la aparición y propagación de esta cepa en individuos cuyos casos fueron asociados a la comunidad[157,158]. Por lo tanto, la profilaxis de las infecciones por *S. aureus* es considerada esencial, especialmente en aquellos pacientes de riesgo. Sin embargo, hasta ahora, ninguno de los muchos esfuerzos para desarrollar una vacuna ha tenido éxito. Por ello, otros enfoques para tratar o prevenir infecciones bacterianas debido a *S. aureus* requieren

[152] Weidenmaier, C., Goerke, C., & Wolz, C. (2012). Staphylococcus aureus determinants for nasal colonization. *Trends in microbiology*, *20*(5), 243-250.
[153] Tong, S. Y., Davis, J. S., Eichenberger, E., Holland, T. L., & Fowler Jr, V. G. (2015). Staphylococcus aureus infections: epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management. *Clinical microbiology reviews*, *28*(3), 603-661.
[154] Prestinaci, F., Pezzotti, P., & Pantosti, A. (2015). Antimicrobial resistance: a global multifaceted phenomenon. *Pathogens and global health*, *109*(7), 309-318.
[155] McGuinness, W. A., Malachowa, N., & DeLeo, F. R. (2017). Vancomycin resistance in Staphylococcus aureus. *The Yale journal of biology and medicine*, *90*(2), 269.
[156] Kallen, A. J., Mu, Y., Bulens, S., Reingold, A., Petit, S., Gershman, K. E. N., ... & Active Bacterial Core surveillance (ABCs) MRSA Investigators of the Emerging Infections Program. (2010). Health care–associated invasive MRSA infections, 2005-2008. *Jama*, *304*(6), 641-647.
[157] David, M. Z., & Daum, R. S. (2010). Community-associated methicillin-resistant Staphylococcus aureus: epidemiology and clinical consequences of an emerging epidemic. *Clinical microbiology reviews*, *23*(3), 616-687.
[158] Fernandez, S., Ledo, C., Lattar, S., Llana, M. N., Bertelli, A. M., Di Gregorio, S., ... & Mollerach, M. E. (2017). High virulence of methicillin resistant Staphylococcus aureus ST30-SCCmecIVc-spat019, the dominant community-associated clone in Argentina. *International Journal of Medical Microbiology*, *307*(4-5), 191-199.

mayor atención[159]. En particular, en las enfermedades de la piel, es recurrente la infección por *S. aureus*, ya sea producto de quemaduras, infecciones agudas como la otitis externa, queratitis, formación de biofilms en el pie diabético y colonización en mucosa nasal, entre otras[160,161]. Esto hace que un tratamiento coadyuvante de aplicación tópica para *S. aureus* sea de gran interés.

La ciprofloxacina [ácido 1-ciclopropil-6-fluoro-1,4-dihidro-4-oxo-7- (piperazin-1-il) quinolona-3-carboxílico] (Figura 3.1), es un antibiótico de amplio espectro con actividad contra muchas bacterias patógenas, tanto Gram-negativas como Gram-positivas, incluyendo *S. aureus*. Este antibiótico actúa mediante la inhibición de la enzima ADN girasa[162]. La ciprofloxacina (CIP) se ha indicado para el tratamiento tópico de otitis media aguda, conjuntivitis aguda y queratitis[163,164]. Debido al hecho que la piel presenta limitaciones tales como una baja retención y permeabilidad de la capa del estrato córneo, el desarrollo de formulaciones dérmicas que contienen CIP ha resultado exitoso como tratamiento adyuvante de infecciones de la piel[165]. Dentro de las formulaciones previamente reportadas que contienen CIP se encuentran los parches transdérmicos[166],

[159] Kavoosi, G., Nateghpoor, B., Dadfar, S. M. M., & Dadfar, S. M. A. (2014). Antioxidant, antifungal, water binding, and mechanical properties of poly (vinyl alcohol) film incorporated with essential oil as a potential wound dressing material. *Journal of Applied Polymer Science*, *131*(20).

[160] Sl, P. (2004). Biofilms and their potential role in wound healing. *Wounds*, *16*, 234-240.

[161] Clebak, K. T., & Malone, M. A. (2018). Skin infections. *Primary Care: Clinics in Office Practice*, *45*(3), 433-454.

[162] Maleki Dizaj, S., Lotfipour, F., Barzegar-Jalali, M., Zarrintan, M. H., & Adibkia, K. (2017). Ciprofloxacin HCl-loaded calcium carbonate nanoparticles: preparation, solid state characterization, and evaluation of antimicrobial effect against Staphylococcus aureus. *Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology*, *45*(3), 535-543.

[163] Chang, V. S., Dhaliwal, D. K., Raju, L., & Kowalski, R. P. (2015). Antibiotic resistance in the treatment of Staphylococcus aureus keratitis: a 20-year review. *Cornea*, *34*(6), 698-703.

[164] Kutz Jr, J. W., Roland, P. S., & H Lee, K. (2013). Ciprofloxacin 0.3%+ dexamethasone 0.1% for the treatment for otitis media. *Expert opinion on pharmacotherapy*, *14*(17), 2399-2405.

[165] Vidyavathi, M., & Srividya, G. (2018). A review on ciprofloxacin: dosage form perspective. *International Journal of Applied Pharmaceutics*, *10*(4), 6-10.

[166] Rathore, P., Bhatia, R., & Nayak, S. (2012). Preparation and characterization of ciprofloxacin loaded transdermal patches. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, *3*(4), 1184.

hidrogeles[167] y cremas niosomales[168]. Sin embargo, las microemulsiones para el tratamiento tópico con CIP son un campo aún poco explorado[169].

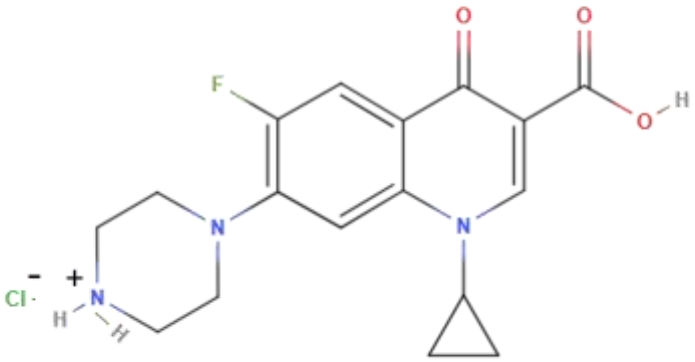


Figura 3.1. Estructura química del antibiótico de amplio espectro ciprofloxacina (CIP).

Como se mencionó anteriormente, las microemulsiones presentan importantes ventajas como sistemas portadores de fármacos de acción tópica, entre las que se destacan la capacidad de proteger a compuestos lábiles, liberar de manera controlada y aumentar la solubilidad y biodisponibilidad de los principios activos, entre otras[170]. Se han desarrollado microemulsiones para el tratamiento de distintas infecciones bacterianas. Alkhatib y col.[171] propusieron una microemulsión compuesta por 23,5% (p/p) de Cremophor EL, 12,5% (p/p) de transcutol, 30% (p/p) de decanoato de etilo y 34% (p/p) de agua, y evaluaron su potencial como sistema de vehiculización de cefalosporina, un antibiótico de amplio espectro contra bacterias Gram-positivas y Gram-negativas. Los estudios concluyeron que la microemulsión cargada con el antibiótico presentó potencial

[167] Hanna, D. H., & Saad, G. R. (2019). Encapsulation of ciprofloxacin within modified xanthan gum-chitosan based hydrogel for drug delivery. *Bioorganic Chemistry*, *84*, 115-124.
[168] Suresh, R. V., & Kerunath, K. P. (2015). Formulation and evaluation of novel anti-bacterial ciprofloxacin loaded niosomal cream. *Int. Res. J. Pharm*, *6*(8), 519-527.
[169] Pradhan, S., Sagiri, S. S., Singh, V. K., Pal, K., Ray, S. S., & Pradhan, D. K. (2014). Palm oil-based organogels and microemulsions for delivery of antimicrobial drugs. *Journal of Applied Polymer Science*, *131*(6).
[170] Biruss, B., & Valenta, C. (2008). The advantage of polymer addition to a non-ionic oil in water microemulsion for the dermal delivery of progesterone. *International journal of pharmaceutics*, *349*(1-2), 269-273.
[171] Alkhatib, M. H., Aly, M. M., Saleh, O. A., & Gashlan, H. M. (2016). Antibacterial activity of a microemulsion loaded with cephalosporin. *Biologia*, *71*(7), 748-756.

efecto sobre *S. aureus*. A su vez, Çağlar y col.[172] desarrollaron microemulsiones a partir del extracto de *Allium sativum* L. como plataformas para elaborar cremas para el tratamiento contra *Acne vulgaris*. Los resultados obtenidos han demostrado el desarrollo de formulaciones prometedoras y de eficacia para su uso en el tratamiento del acné. Por otra parte, Koushki y col.[173] desarrollaron microemulsiones a partir de distintos componentes utilizando ácido oleico y Transcutol-P como fase oleosa, Tween 80 y Span 20 como surfactantes y propilenglicol como co-surfactante. Posteriormente cargaron las microemulsiones obtenidas con el antibiótico de amplio espectro levofloxacino para evaluar la administración ocular del fármaco. Según sus investigaciones, las características fisicoquímicas, las propiedades químicas y la liberación *in-vitro* de levofloxacino en la córnea de conejo se vieron significativamente afectadas por la composición general de las microemulsiones. Estos hallazgos resaltan la importancia de considerar cuidadosamente la composición de las microemulsiones para optimizar sus propiedades como sistemas portadores en aplicaciones de administración de fármacos.

Por otra parte, las microemulsiones pueden actuar como potenciadores de la permeación ya sea a través de la reducción de la barrera de difusión del estrato córneo de la piel como al promover la partición del fármaco en la piel aumentando así la tasa de permeabilidad[174]. En ese sentido, los componentes de la microemulsión pueden actuar como potenciadores de la penetración cuando se aplican tópicamente, reduciendo temporalmente el efecto barrera de la piel y promoviendo el transporte del fármaco a través de ella, ya que estos sistemas actúan como posibles transportadores de compuestos hidrofílicos y lipofílicos al aumentar su solubilidad y biodisponibilidad. Como ya se ha mencionado, Virani y col[46]. desarrollaron y caracterizaron formulaciones basadas en microemulsiones utilizando componentes potenciadores de la penetración como posibles sistemas de administración transdérmica de risperidona, un fármaco antipsicótico. La microemulsión óptima estuvo compuesta por 15,0% (p/p) de ácido oleico como fase oleosa, 15,0% (p/p) de Tween 80 como surfactante, 20,0% (p/p) de alcohol isopropílico

[172] Çağlar, E. Ş., Reis, R., Karadağ, A. E., Demirci, F., Sipahi, H., Aydın, A., & Üstündağ Okur, N. (2025). Preparation, characterization, and in vitro evaluation of microemulsion based cream formulations for the topical treatment of acne vulgaris. *Journal of Surfactants and Detergents, 28*(1), 13-24.

[173] Koushki, E., Salimi, A., & Loveimirad, K. (2025). Preparation and evaluation of levofloxacin microemulsion for ocular drug delivery. *Journal of Research in Pharmacy, 29*(1)

[174] Shukla, T., Upmanyu, N., Agrawal, M., Saraf, S., Saraf, S., & Alexander, A. (2018). Biomedical applications of microemulsion through dermal and transdermal route. *Biomedicine & Pharmacotherapy, 108*, 1477-1494.

como co-surfactante y 50,0% (p/p) de agua. Los estudios de permeabilidad demostraron que esta microemulsión presentó una mayor capacidad de penetración del fármaco en comparación con una solución control de risperidona en propilenglicol. Estos resultados sugieren que las microemulsiones podrían ser una plataforma prometedora para la administración transdérmica de risperidona, ofreciendo una alternativa eficaz para la administración de este fármaco.

Por otro lado, Hathout y col.[175] estudiaron la administración transdérmica de clorhidrato de betahistina, un fármaco que en general es administrado por vía oral para el tratamiento del vértigo. El fármaco fue encapsulado en diversas formulaciones tipo microemulsión compuestas por oleato de etilo entre 10,0 y 40,0% (p/p), Capryol 90® entre 27,5 y 35,0% (p/p), Transcutol® entre 27,5 y 35,0% (p/p) y agua entre 5,0 y 20,0% (p/p). Los estudios de permeación cutánea demostraron que todas las microemulsiones evaluadas redujeron significativamente la resistencia cutánea tras su aplicación durante 24 h. Estos resultados confirman la superioridad de las microemulsiones en la alteración y disminución reversible de la función barrera cutánea y, por lo tanto, estos sistemas surgen como una alternativa prometedora para la administración tópica de clorhidrato de betahistina.

El propósito principal en esta etapa del trabajo fue analizar el comportamiento de la microemulsión (o/w) sintetizada en el trabajo previo como portador del antibiótico de amplio espectro ciprofloxacina para su potencial aplicación tópica e intranasal y evaluar su eficacia mediante estudios analíticos y biológicos *in-vitro* e *in-vivo* utilizando un modelo murino.

3.3 Parte Experimental

3.3.1 Reactivos y soluciones

Se utilizó agua ultrapura (18 MΩ cm^{-1}) y todos los reactivos utilizados fueron de calidad analítica.

[175] Hathout, R. M., & Nasr, M. (2013). Transdermal delivery of betahistine hydrochloride using microemulsions: physical characterization, biophysical assessment, confocal imaging and permeation studies. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, *110*, 254-260.

- Ácido acético glacial (Merck®, Alemania).
- Agar tripticasa de soja (Britania®, Argentina).
- Caldo Mueller Hinton (Difco®, Argentina).
- Caldo tripticasa de soja (Britania®, Argentina).
- Ciprofloxacina clorhidrato (Parafarm®, Argentina).
- Colorante cristal violeta (Britania®, Argentina).
- Etanol absoluto (Dorwil®, Argentina).
- Fosfato de sodio dibásico (Anedra, Argentina).
- Fosfato de potasio monobásico (Anedra, Argentina).
- Glicerol (Dorwil®, Argentina).
- Glucosa (Britania®, Argentina).
- Ketamina (König®, Argentina).
- Miristato de isopropilo (Sigma-Aldrich®, Estados Unidos).
- Metanol (Merck®, Alemania).
- Polisorbato 80 (Sigma-Aldrich®, Estados Unidos).
- Xilazina (Bayer®, Argentina).

Las soluciones de trabajo de ciprofloxacina se prepararon mediante la dilución adecuada de una solución madre que contenía 0,300 g de ciprofloxacina clorhidrato en 100 mL de agua destilada:etanol absoluto (1:1).

La solución aceptora fue una solución de buffer fosfato (PBS, del inglés *phosphate buffer solution*) de pH=7,4 la cual se preparó disolviendo 0,9474 g de fosfato monobásico de potasio (KH_2PO_4) y 0,9460 g de fosfato dibásico de sodio dibásico (Na_2HPO_4) en 100,0 mL de agua, respectivamente. Entonces, se tomaron 19,6 mL de la primera solución (KH_2PO_4) y se llevaron a 100,0 mL con la segunda solución (Na_2HPO_4)

para obtener finalmente el PBS. El valor de pH se verificó y, en caso necesario, se ajustó utilizando las mismas soluciones hasta alcanzar el pH deseado.

3.3.2 Obtención y carga de las microemulsiones

Como se mencionó, en este trabajo se utilizó como sistema portador la microemulsión obtenida en el trabajo previo (Capítulo 2). Por lo tanto, la microemulsión fue preparada pesando 0,250 g de aceite, 2,800 g de surfactante y 1,400 g de co-surfactante. Luego se tituló con agua ultrapura bajo agitación magnética suave. De esta manera, la microemulsión estuvo conformada por 2,5% (p/p) de MIP como fase oleosa, 42,0% (p/p) de una mezcla de TW80:ET (2:1), y agua (55,5%) como fase acuosa. Este sistema fue cargado con CIP en una concentración final de 0,3% (p/p). Para ello, el antibiótico fue incorporado en la microemulsión previamente formada, bajo agitación magnética suave hasta total disolución de CIP en la misma.

3.3.3 Caracterización fisicoquímica de las microemulsiones

La determinación de Z, PdI y Pz de las muestras de microemulsiones cargadas con ciprofloxacina (CIP-ME) se realizó mediante DLS utilizando un instrumento marca Malvern® modelo Zetasizer Nanoserie (Malvern, Reino Unido) asistido por el software v7.12 (Malvern®). Las funciones de autocorrelación se analizaron por el método de los cumulantes (ajustando un solo exponencial a la función de correlación para obtener el tamaño medio) y el método de distribución (para ajustar un exponencial múltiple a la función de correlación para obtener distribuciones de tamaño de gota). El PdI fue calculado a partir del algoritmo de distribución y se determinaron los valores para cada pico como ancho de pico/diámetro medio. Se midió la dispersión en una celda de borosilicato de 4 mL de calidad óptica en un ángulo de 90°. Las muestras de CIP-ME se analizaron previa dilución de las mismas 1:10 en agua destilada. Todas las mediciones se llevaron a cabo a 25°C. Las mediciones de Pz se realizaron previa filtración de la muestra utilizando un filtro con un tamaño de poro de 0,45 μm. Las mediciones de pH se realizaron utilizando un medidor de pH marca Orion modelo 710 (Beverly, Estados Unidos) y un electrodo Orion-Ross® modelo 81-02. Para ello, se dispersó 1,0 g de cada muestra en 10,0 mL de agua ultrapura y se agitó durante 2 h a temperatura ambiente (25°C). Por otro lado, la determinación del IR se realizó por medio de un refractómetro marca Atago®

modelo RX-5000 (Bellevue, Estados Unidos). Se tomaron 20 µL de muestra y se colocaron en el portamuestra del refractómetro a 25°C. Las medidas de CE de las formulaciones se llevaron a cabo por medio de un conductímetro portátil marca Adwa® modelo AD32 (Szeged, Hungría). En este caso, se sumergió el electrodo en 10 mL de muestra a temperatura ambiente. Además, se obtuvo la osmolaridad de las formulaciones a partir de la Ecuación 3.1:

$$mOsm\ L^{-1} = \frac{C\ (g\ L^{-1})}{PM\ (g)} \times 10.000 \qquad \text{Ecuación 3.1}$$

donde C es la concentración de CIP y PM su peso molecular.

3.3.4 Morfología de las microemulsiones

Se evaluó la morfología de CIP-ME mediante TEM. Para ello, se colocó una gota de la muestra sobre una rejilla de cobre revestida con Formvar (200 mesh) y se realizó una tinción negativa con solución de acetato de uranilo durante 1 min. Antes de la observación, la muestra se secó a temperatura ambiente (25°C). La imagen se visualizó con un microscopio electrónico marca JEOL modelo 100 CX-II (Tokio, Japón) operado a 80 kV.

3.3.5 Estudios analíticos

3.3.5.1 Estudio de la distribución de ciprofloxacina en la microemulsión

Debido a que CIP es moderadamente soluble en agua se abordó un estudio analítico para determinar la ubicación del antibiótico en la estructura de la microemulsión. Para ello se prepararon soluciones de CIP al 0,3% (p/p) en cada uno de los componentes de la microemulsión, es decir, agua (CIP-agua), MIP (CIP-MIP) y TW80:ET (CIP-Smix). Estas soluciones junto con CIP-ME fueron analizadas por espectrometría de fluorescencia molecular utilizando un espectrofluorímetro marca Jasco modelo FP-6500 (Tokio, Japón). El ancho de la hendidura fue de 2,5 nm para la excitación y de 3 nm para la emisión de radiación. La longitud de onda de excitación fue de 270 nm y los espectros de emisión se registraron entre 350 y 600 nm. La velocidad de escaneo fue de 2000 nm min^{-1} y el voltaje del tubo fotomultiplicador fue de 350 V. Las medidas se realizaron

utilizando una celda de flujo de cuarzo de 4 mL la cual se colocó en geometría de ángulo recto (90°).

3.3.5.2 Estudio de permeación on-line

El proceso de permeación de CIP fue monitoreado en un sistema automático de flujo continuo acoplado a una celda de difusión de Franz tradicional y con detección fluorescente en línea desarrollado en nuestro laboratorio (Figura 3.2). El estudio fue realizado tanto para la formulación CIP-ME como para la CIP en forma libre, es decir en un medio no-organizado (CIP-NO) con el fin de comparar la permeación *in-vitro* de CIP cuando se encuentra en diferentes medios. CIP-NO se preparó mediante la dilución de 0,300 g de CIP en 100 mL de una mezcla etanol: agua (1:1). La celda de difusión de Franz utilizada fue la descrita en la sección 2.3.6.2, Capítulo 2 (pág. 66). Para los ensayos se utilizó una membrana sintética de acetato de celulosa (Whatman®, Reino Unido) con un área de 3,14 cm^2. Antes de realizar los experimentos, la membrana se sumergió en la solución aceptora (PBS) de pH=7,4 durante 24 h. La celda de Franz se termostatizó con un sistema de circulación de agua para mantener la temperatura en 32°C en la superficie de la membrana, emulando así las condiciones de la piel humana. Como puede verse en la Figura. 3.2, la membrana sintética se montó entre las cámaras donadora y aceptora. Entonces, el compartimento aceptor se llenó con 25 mL de solución PBS la cual se mantuvo bajo agitación constante mediante una barra magnética de politetrafluoroetileno (PTFE) propulsada por un agitador magnético marca Hanna Instruments modelo HL190 M (Rhode Island, Estados Unidos) a una velocidad de 300 rpm. Para iniciar el estudio se colocó en el compartimento donador una alícuota de 0,100 g de muestra (CIP-ME ó CIP-NO) y se cubrió dicho compartimento con parafilm para evitar la evaporación de la misma. El muestreo se realizó a tiempos regulares, aspirando 100 µL de la solución aceptora mediante la activación automática de una bomba peristáltica marca Gilson® modelo Minipuls 3 (Villiers-le-Bel, Francia). Para este paso, la bomba peristáltica operó a 13 rpm y se utilizó un tubo Tygon® de 0,50 mm de diámetro interior. Así, las muestras fueron impulsadas hacia el detector y los correspondientes espectros de fluorescencia molecular fueron registrados a intervalos de 3 min y durante 90 min, con el equipo y condiciones descritas en la sección anterior (3.3.5.1). Es importante destacar que el volumen de muestra aspirado en cada análisis fue recuperado en simultáneo con solución aceptora por activación automática de la bomba peristáltica. Todo el procedimiento se

comandó por Arduino® e involucró la activación y el sentido de la bomba peristáltica y el registro de los espectros en el espectrofluorímetro. Por otra parte, la cuantificación de CIP se realizó mediante una curva de calibrado, la cual fue construída con seis soluciones estándar en un rango de 0,37 a 18,00 mg L^{-1} de CIP.

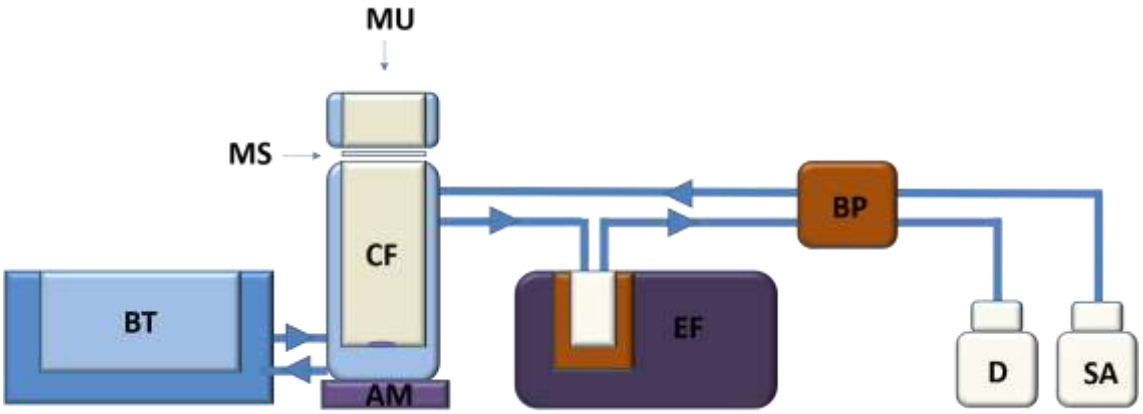


Figura 3.2. Sistema de flujo continuo automático acoplado a una celda de difusión de Franz con detección fluorescente desarrollado en el laboratorio. Las flechas indican la dirección de los fluidos. El procedimiento estuvo comandado por Arduino. AM: agitador magnético; BP: bomba peristáltica; BT: baño termostatizado; CF: celda de difusión de Franz; D: desechos; EF: espectrofluorímetro; MS: membrana sintética; MU: muestra; SA: solución aceptora.

3.3.6 Estudios de actividad antibacteriana

3.3.6.1 Cepas y condiciones de crecimiento bacteriano

Para la realización de los estudios de actividad antibacteriana se utilizó la cepa *S. aureus* Newman la cual es susceptible a CIP en concentraciones iguales a 1 µg mL^{-1}. Las cepas se cultivaron en caldo de tripticasa de soja (TSB, del inglés *trypticase soy broth*) a 37°C durante 18 h y agitando a 200 rpm. El número de colonias viables se obtuvo al colocar una alícuota de cultivo en una serie de diluciones en agar de tripticasa de soja (TSA, del inglés *trypticase soy agar*). Las bacterias se almacenaron a -80°C en TSB con 20% de glicerol hasta su uso.

3.3.6.2 Concentración inhibitoria mínima

La concentración inhibitoria mínima (CIM) se define como la mínima concentración de antibiótico que inhibe el crecimiento bacteriano después de una

exposición de 18 h[176]. La CIM es ampliamente utilizada para evaluar la eficacia *in-vitro* de los antimicrobianos, ya que además de confirmar resistencias inusuales, da respuestas definitivas cuando el resultado obtenido por otros métodos es indeterminado[177]. Dentro de los métodos más utilizados para determinar la CIM se puede mencionar el método de dilución en caldo. Este método consiste en exponer las bacterias a concentraciones crecientes de antibiótico en un medio líquido, usualmente un caldo nutritivo, con el fin de identificar la menor concentración capaz de inhibir visiblemente el crecimiento bacteriano. Este método puede realizarse en tubos de ensayo (macrodilución), o en placas de pocillos (microdilución). Esta última constituye la modalidad más utilizada en la actualidad debido a su eficiencia y menor consumo de reactivos[178].

En este trabajo, se determinó la CIM para la formulación CIP-ME por el método de microdilución de acuerdo con las directrices del CLSI (del inglés *Clinical and Laboratory Standards Institute*) [179]. Se evaluaron concentraciones en el rango de 1500 a 46,87 μg mL^{-1}. Cultivos de cepas de *S. aureus* Newman ajustados a una turbidez de 0,5 de la escala McFarland en caldo Mueller Hinton se colocaron en una placa de poliestireno estéril de 96 pocillos (Greiner BioOne®) y se inoculó en una serie de diluciones de la microemulsión cargada con ciprofloxacina (CIP-ME) y la microemulsión sin cargar (ME2) para obtener una densidad celular final de 10^5 UFC mL^{-1}. Por otro lado, se utilizó medio de cultivo libre de bacterias y de formulación como grupo control. Después de la incubación de la placa durante 18 h a 37°C, se midió el crecimiento bacteriano leyendo la absorbancia a 595 nm usando un lector de microplacas Multiskan EX de Thermo Electron Corporation (Waltham, Estados Unidos).

3.3.6.3 Actividad anti-biofilm

S. aureus es una bacteria patógena oportunista capaz de formar biopelículas, también denominadas como *biofilms*. Estas estructuras están conformadas por

[176] Davoodi, M., Kavoosi, G., & Shakeri, R. (2017). Preparation and characterization of potato starch-thymol dispersion and film as potential antioxidant and antibacterial materials. *International Journal of Biological Macromolecules*, *104*, 173-179.
[177] Andrews, J. M. (2001). Determination of minimum inhibitory concentrations. *Journal of antimicrobial Chemotherapy*, *48*, 5-16.
[178] Qaiyumi, S. (2007). Macro-and microdilution methods of antimicrobial susceptibility testing. *Antimicrobial susceptibility testing protocols*, 75-79.
[179] Patel, J.B. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically (M07A10), 3 (2015) 17–24 CLSI, tenth ed.

comunidades bacterianas organizadas en una matriz extracelular de naturaleza polimérica producida por los propios microorganismos. Cabe destacar que las bacterias que crecen en biopelículas exhiben un conjunto de propiedades emergentes que difieren sustancialmente de las células bacterianas de vida libre. Esta capacidad les confiere una notable resistencia a antibióticos y al sistema inmune, representando un desafío clínico significativo[180].

La evaluación de la actividad *anti-biofilm* de compuestos antimicrobianos como la ciprofloxacina se basa en métodos *in-vitro* que permiten cuantificar la formación, inhibición o erradicación de biofilms. Entre los métodos más utilizados y estandarizados para cuantificar la biomasa total de biofilms bacterianos se puede mencionar el método de tinción con cristal violeta. El ensayo se realiza en microplacas de 96 pocillos, donde se inoculan las suspensiones bacterianas en condiciones que favorecen la formación de biopelículas. Luego de un período de incubación, se retira el medio y se eliminan las células planctónicas mediante lavados suaves con solución salina tamponada. A continuación, se adiciona el antibiótico a distintas concentraciones y se incuba nuevamente para evaluar su efecto sobre el biofilm establecido o en formación. Tras el tratamiento, los pocillos se lavan cuidadosamente para remover el material no adherido, y se fija la biopelícula residual. La biomasa adherida se tiñe con una solución de cristal violeta que se deja actuar durante aproximadamente 15 min. El exceso de colorante se elimina por lavado, y el colorante retenido, que se une a la matriz extracelular y a las células adheridas, se solubiliza con etanol o ácido acético glacial al 30-95%. Finalmente, la absorbancia se mide en un espectrofotómetro a 570 nm. Los resultados se expresan generalmente como absorbancia relativa o como porcentaje de inhibición en comparación con un control sin tratamiento. Este método permite una evaluación cuantitativa sencilla, económica y reproducible de la formación de biofilms, aunque no diferencia entre células vivas y muertas ni informa sobre la viabilidad bacteriana[181].

En este trabajo, se evaluó la actividad anti-biofilm de la formulación propuesta. Para ello, se cultivó la cepa *S. aureus* Newman durante 18 h y se diluyó 1:100 en TSB enriquecido con 0,25% (p/v) de glucosa (TSBg). Entonces, se añadieron 200 µL de estas

[180] Kashef, M. T., Saleh, N. M., Assar, N. H., & Ramadan, M. A. (2020). The antimicrobial activity of ciprofloxacin-loaded niosomes against ciprofloxacin-resistant and biofilm-forming Staphylococcus aureus. *Infection and Drug Resistance*, 1619-1629.

[181] Adetunji, V., & Odetokun, I. A. (2012). Assessment of biofilm in E. coli O157: H7 and Salmonella strains: influence of cultural conditions. *Am. J. Food Technol*, *7*(10), 582-595.

suspensiones celulares a placas de microtitulación de poliestireno estéril de 96 pocillos para formar biofilms maduros después de 24 h de incubación estática a 37°C. Luego, se procedió a retirar cuidadosamente 100 µL de medio de cultivo de cada pocillo y el mismo volumen de las formulaciones propuestas fue añadido. Después de otras 24 h de incubación estática a 37°C, se retiró el medio de cultivo de cada pocillo y las placas se lavaron dos veces con PBS. Los biofilms se fijaron con metanol puro durante 15 min y se procedió a la tinción con cristal violeta al 0,5% durante 20 min, y posterior lavado suave dos veces con agua corriente. La cantidad de biomasa de los biofilms fue determinada después de la adición de ácido acético glacial al 30% leyendo y midiendo la absorbancia a 595 nm utilizando el lector de microplacas.

3.3.6.4 Estudios de eficacia terapéutica *in-vivo* mediante un modelo murino

Para llevar a cabo los estudios de eficacia terapéutica *in-vivo* se obtuvieron y mantuvieron ratones hembras en el bioterio del Instituto de Investigaciones en Microbiología y Parasitología Médica (IMPaM, Universidad de Buenos Aires-CONICET, Argentina) de conformidad con las directrices internacionales establecidas por la Directiva de la UE 2010/63/UE para experimentos con animales[182]. Además, los procedimientos con animales de laboratorio siguieron las pautas aceptadas por los Institutos Nacionales de Salud[183].

3.3.6.4.1 Estudio de colonización nasal

La portación nasal de *S. aureus* se considera un factor de riesgo para el desarrollo de infecciones, por lo que resulta fundamental el diseño de estrategias de descolonización nasal. Aunque los ratones no son colonizados naturalmente por *Staphylococcus*, constituyen un buen modelo para estudiar la colonización nasal por este patógeno. Cabe destacar que los modelos murinos son sencillos de manipular y permiten la

[182] Legislation for the protection of animals used for the scientific purposes.
[183] National Institutes of Health, Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, National Research Council Guide, Washington, DC, 1996.

reproducibilidad entre laboratorios, por lo que resultan adecuados para este tipo de estudios[184].

En el presente estudio de colonización nasal, ratones exógenos CF1 (de ocho semanas de edad y aproximadamente 25 g de peso) fueron anestesiados con ketamina/xilazina e inoculados por vía intranasal con 20 µL de una suspensión bacteriana que contenía 6×10^9 UFC mL^{-1} de la cepa *S. aureus* Newman. Después de 24 h, los ratones se dividieron aleatoriamente en 3 grupos de 4–7 animales y recibieron por vía intranasal 20 µL de la formulación propuesta. A su vez, se utilizó un grupo control de colonización al cual se le inocularon 20 µL de PBS. Después de 24 h, los ratones fueron sacrificados con CO_2. El área alrededor de la región nasal fue eliminada con etanol al 70%, y se procedió a extirpar la nariz usando una amoladora para tejidos. Luego se homogeneizó el material extraído en 400 µL de TSB. Las diluciones del tejido homogeneizado se colocaron en placas de TSA para el recuento de las correspondientes unidades formadoras de colonias (UFC)[185].

3.3.6.4.2 Estudio de infección cutánea

Los modelos de infección animal constituyen una herramienta fundamental para el estudio de la relación huésped-patógeno, ya que permiten aproximarse al complejo entorno del cuerpo humano. Las infecciones bacterianas de la piel y los tejidos blandos son altamente prevalentes a nivel mundial, siendo *S. aureus* uno de los principales patógenos involucrados y principal causa de este tipo de infecciones. Para profundizar en la comprensión de la patogénesis estafilocócica, se han desarrollado diversos modelos murinos de infección[186,187]. En particular, el modelo murino de infección cutánea inducida por inoculación subcutánea de *S. aureus* ha demostrado ser útil para estudiar distintos

[184] Silva, J. G. D., Boechat, J. P., Silva, B. D., Müller, R., & Senna, J. P. (2024). Monitoring Staphylococcus aureus nasal colonization murine model using a bioluminescent methicillin-resistant S. aureus (MRSA). *Laboratory Animals*, *58*(3), 231-239.
[185] Barbagelata, M. S., Alvarez, L., Gordiola, M., Tuchscherr, L., von Eiff, C., Becker, K., ... & Buzzola, F. (2011). Auxotrophic mutant of Staphylococcus aureus interferes with nasal colonization by the wild type. *Microbes and infection*, *13*(12-13), 1081-1090.
[186] Watts, A., Ke, D., Wang, Q., Pillay, A., Nicholson-Weller, A., & Lee, J. C. (2005). Staphylococcus aureus strains that express serotype 5 or serotype 8 capsular polysaccharides differ in virulence. *Infection and immunity*, *73*(6), 3502-3511.
[187] Lukomski, S., Montgomery, C. A., Rurangirwa, J., Geske, R. S., Barrish, J. P., Adams, G. J., & Musser, J. M. (1999). Extracellular cysteine protease produced by Streptococcus pyogenes participates in the pathogenesis of invasive skin infection and dissemination in mice. *Infection and immunity*, *67*(4), 1779-1788.

aspectos de la enfermedad, como la virulencia de diferentes cepas, el desarrollo de la infección, y la eficacia potencial de terapias antibióticas o vacunas[188].

Para el estudio de infección cutánea, se eligió la cepa *S. aureus* MW2 (linaje USA400) como una cepa MRSA representativa asociada a la comunidad[189]. Así, se rasuró la parte superior de la espalda de los ratones CF1. Luego, los ratones fueron anestesiados con ketamina/xilazina y se inocularon por vía subcutánea con 100 µL en cada flanco con una suspensión bacteriana que contenía aproximadamente 7×10^8 UFC mL^{-1} de la cepa *S. aureus* MW2. La Figura 3.3A-D, muestra el procedimiento descrito. Después de 24 h, los ratones se dividieron aleatoriamente en 3 grupos de 4–7 animales y las lesiones fueron tratadas superficialmente con 100 µL de la formulación propuesta. A su vez, se utilizó un grupo control de infección al cual se le inocularon 100 µL de PBS. Después de 24 h, los ratones fueron sacrificados con CO_2. El área de la piel alrededor del absceso fue extirpado, pesado y homogeneizado en 1 mL de PBS en hielo usando una amoladora de tejidos. Las diluciones del homogeneizado de tejidos se colocaron en placas de TSA para contar las correspondientes UFC.

[188] Malachowa, N., Kobayashi, S. D., Braughton, K. R., & DeLeo, F. R. (2013). Mouse model of Staphylococcus aureus skin infection. *Mouse Models of Innate Immunity: Methods and Protocols*, 109-116.

[189] Anderson, K. L., Roberts, C., Disz, T., Vonstein, V., Hwang, K., Overbeek, R., ... & Dunman, P. M. (2006). Characterization of the Staphylococcus aureus heat shock, cold shock, stringent, and SOS responses and their effects on log-phase mRNA turnover. *Journal of bacteriology*, *188*(19), 6739-6756.

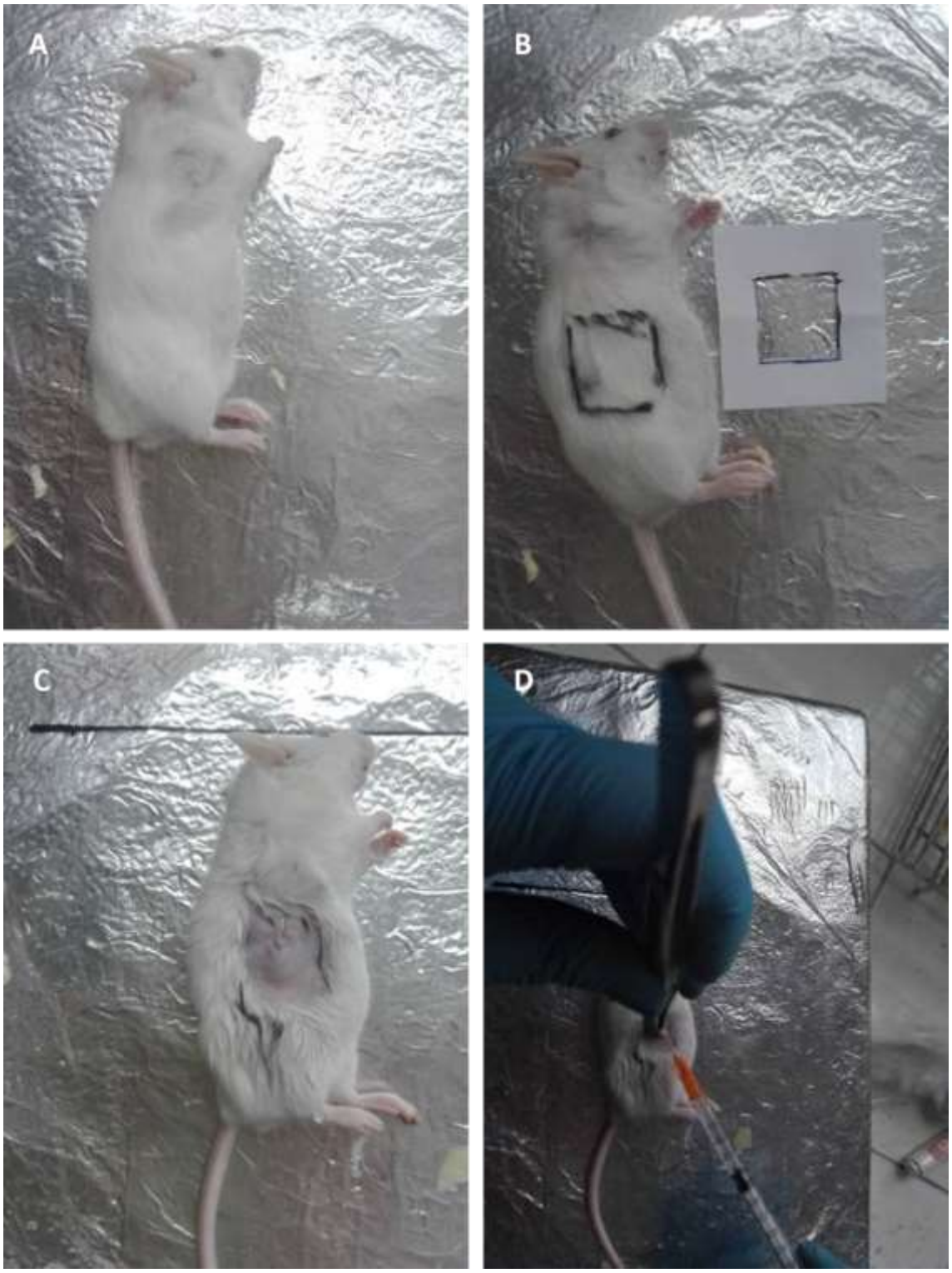


Figura 3.3. Fotografías representativas del estudio de infección cutánea. A) Ratón CF1 de ocho semanas de edad, en condiciones basales. B) Selección del área dorsal seleccionada para el estudio C) Zona delimitada tras el rasurado, previo a la inoculación. D) Inoculación con una suspensión bacteriana de aproximadamente 7×10^8 UFC mL^{-1} de la cepa *S. aureus* MW2.

3.4 Resultados y Discusión

3.4.1 Obtención, caracterización fisicoquímica y morfología de las microemulsiones

Como puede verse en la Figura 3.4, CIP-ME mostró ser un sistema transparente que además resultó ópticamente isotrópico y termodinámicamente estable, lo cual es compatible con un sistema del tipo microemulsión.

Figura 3.4. Formulación CIP-ME conformada por MIP (2,5%), Smix (42,0%) y agua (55,5%) y cargada con un 0,30% (p/p) del antibiótico CIP.

Por otro lado, CIP-ME resultó ser un sistema monodisperso con un PdI de (0,259 ± 0,021) y un tamaño de gota de (13,44 ± 0,24) nm. La Figura 3.5A muestra la distribución de tamaño obtenida a través de DLS. El valor de Pz obtenido fue de (−7,19 ± 0,02) mV (Figura 3.5B), y como ya se ha mencionado, esto probablemente se deba al uso de un surfactante no-iónico como lo es el Tween 80, ya que este tipo de surfactante suele exhibir carga negativa al poseer en su estructura una cadena de polioxietileno. Además, la morfología esférica de las microgotas de CIP-ME y su tamaño nanométrico fue corroborado por TEM, tal como puede observarse en la Figura 3.6. Esta formulación presentó un valor de pH de 5,32 ± 0,01 el cual resultó óptimo para uso tópico e intranasal. Por otro lado, la formulación propuesta presentó una osmolaridad de 341,9 mOsm L^{-1} la cual resulta adecuada para la instilación.

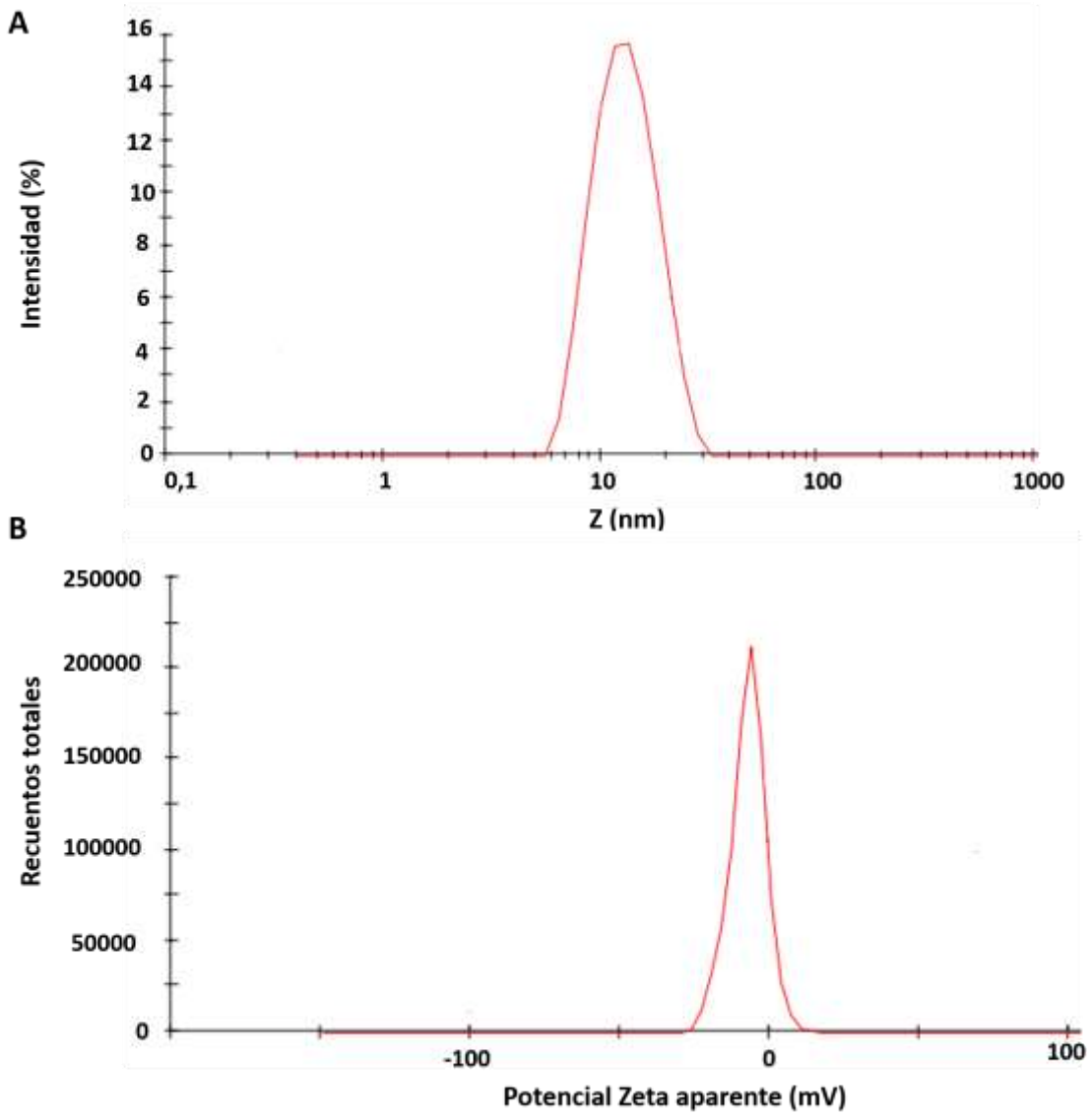


Figura 3.5. Caracterización fisicoquímica de la microemulsión cargada con el antibiótico CIP (CIP-ME). A) Gráfico de la distribución del tamaño de gota de CIP-ME obtenida por DLS. B) Gráfico del barrido de potencial de CIP-ME. Las determinaciones se realizaron por triplicado (n = 3)

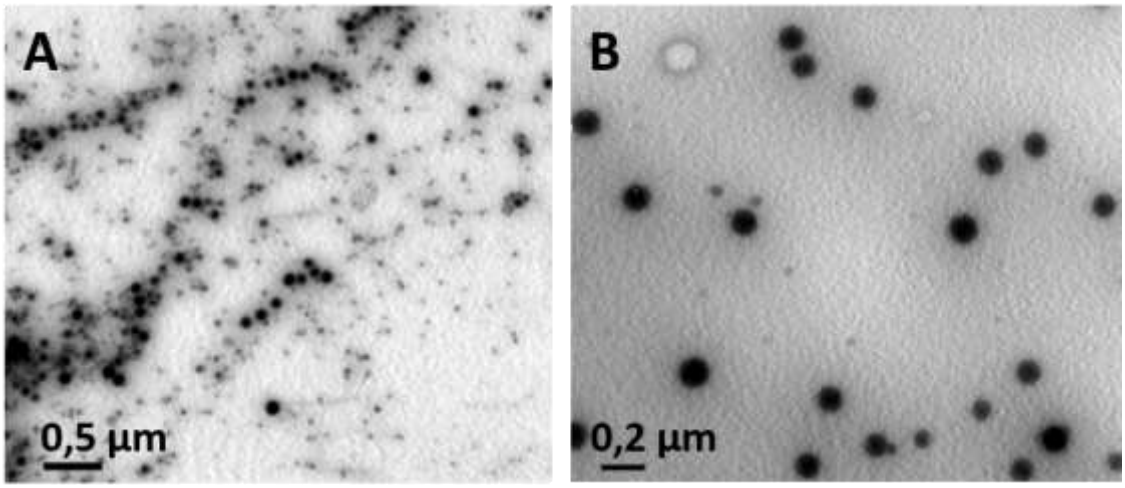


Figura 3.6. Microfotografías obtenidas por TEM en las cuales puede apreciarse la morfología y tamaño de las microgotas de CIP-ME. A) Aumento de 100.000X; B) Aumento de 270.000X.

3.4.2 Estudio de la distribución de ciprofloxacina en la microemulsión

CIP es un antibiótico moderadamente soluble en agua con una constante de solubilidad de 36 mg mL^{-1} a 25°C [190,191]. Tal como se muestra en la Figura 3.1, CIP presenta tanto grupos hidrofílicos como grupos hidrofóbicos en su estructura[192,193]. Por lo tanto, es de esperar que la parte polar de la molécula se ubique en la interfase (fase oleosa-fase acuosa) de la microemulsión en contacto con la región hidrofílica del surfactante (TW80), y que parte del grupo no polar de CIP esté asociado con la fase oleosa (MIP).

Para corroborar este supuesto, y dado que CIP presenta fluorescencia molecular en los distintos componentes de la microemulsión, se registraron los espectros de CIP-ME y de CIP en cada uno de los componentes individuales (CIP-agua, CIP-MIP y CIP-Smix). Como puede observarse en la Figura 3.7, el máximo de emisión de CIP-agua (449 nm) resultó levemente superior al máximo de emisión de CIP-ME (448 nm). Por el contrario, puede percibirse un desplazamiento a menores longitudes de onda de emisión para CIP-MIP (431 nm) y CIP-Smix (445 nm) con respecto a CIP-ME (448 nm). Estos

[190] Argentina, F. 7º ed.[FA 7º]. Ministerio de Salud de la Nación, ANMAT (2003). Farmacopea Argentina, Volumen II, 254.
[191] Xu, Q. A., & Madden, T. L. (2011). Analytical methods for therapeutic drug monitoring and toxicology. John Wiley & Sons
[192] Tnsuji, K. Surface Activity, Principle Phenomena and Applications, Academic Press, 1988, 211.
[193] Nagappa, A. N., Kole, P. L., Pandi, P. V., & Patil, R. T. (2004). Transport studies through liquid membranes of ciprofloxacin and norfloxacin. Indian J. Biochem. Biophys. 41 (1) 48–52.

resultados sugieren que CIP podría estar distribuida en la interfase del sistema propuesto constituida por Smix e interaccionando con la parte polar del surfactante el cual está en contacto con la fase acuosa[194].

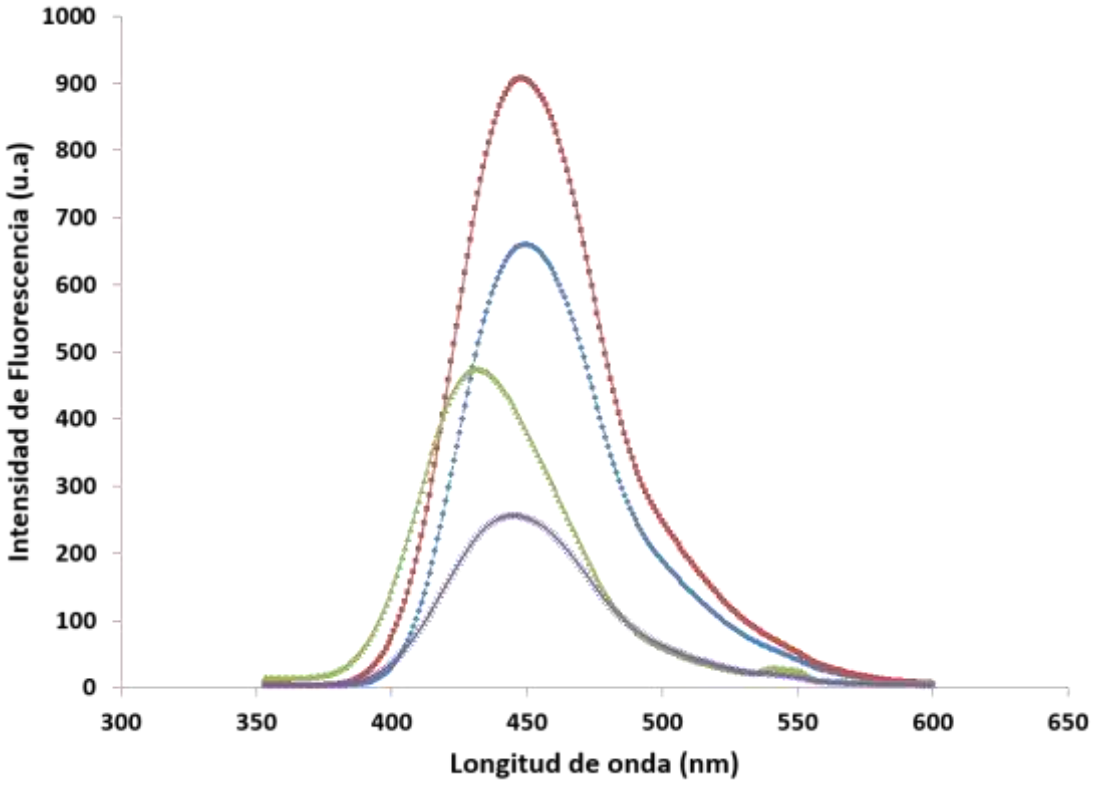


Figura 3.7. Espectros de fluorescencia molecular de CIP-ME (rojo; max=448 nm) y de CIP en cada uno de los componentes de la microemulsión: CIP-agua (celeste, max=449 nm), CIP-MIP (verde; max=431 nm) y CIP-Smix (violeta; max=445 nm).

3.4.3 Estudio analítico de permeación

3.4.3.1 Sistema automático on-line

El proceso de permeación de CIP en las muestras analizadas se llevó a cabo utilizando un sistema automático en línea acoplado a la celda de difusión de Franz tradicional. Para ello, se ajustaron las variables hidrodinámicas, evaluando un rango de caudales entre 0,10 y 0,40 mL min^{-1}. El valor óptimo se estableció en 0,25 mL min^{-1}, lo que permitió registrar los espectros de fluorescencia en los intervalos de tiempo requeridos (5 min) ya que solo se necesitaron 24 s para aspirar 100 µL de muestra. El

[194] Nazar, M. F., Khan, A. M., & Shah, S. S. (2009). Microemulsion system with improved loading of piroxicam: a study of microstructure. *AAPS PharmSciTech*, *10*, 1286-1294.

mismo caudal (0,25 mL min^{-1}) fue utilizado para recuperar con solución aceptora el volumen de muestra (100 µL) dirigido al detector en cada tiempo de muestreo. Este proceso se llevó a cabo simultáneamente con la aspiración de la muestra, asegurando que el volumen total de solución aceptora en la celda de Franz permaneciera constante. Los componentes del sistema en línea fueron controlados íntegramente mediante un accionador electrónico construido en el laboratorio con Arduino. Dicho accionador fue desarrollado con 4 salidas de 12V que al activarse mediante software permitieron la activación simultánea o secuencial de la bomba peristáltica, la bomba de circulación del baño de agua y el agitador magnético durante tiempos establecidos para llevar a cabo el muestreo y reposición de muestra, la termostatización de la celda y agitación de la solución aceptora, respectivamente. La activación de la salida conectada al detector permitió el registro secuencial de los espectros de fluorescencia molecular en los intervalos de tiempo definidos.

En comparación con el método tradicional, el sistema propuesto presentó varias ventajas, como el muestreo automático, el control preciso de la temperatura y de la agitación, y el registro automático de espectros que posibilitaron la monitorización en tiempo real del proceso de permeación. Estas características no solo permitieron reducir errores humanos, sino que también disminuyeron el tiempo de análisis con respecto al procedimiento manual y la determinación mediante técnicas separativas como la cromatografía, comúnmente utilizadas en este tipo de estudios.

3.4.3.2 Análisis espectral y determinación de las constantes de permeación

Los espectros de emisión de fluorescencia molecular a lo largo del proceso de permeación correspondientes a CIP-NO y CIP-ME se muestran en la Figura 3.8A y 3.8B, respectivamente. A simple vista puede observarse que los espectros correspondientes a CIP-NO alcanzaron menores valores de intensidad de fluorescencia en el período de permeación estudiado respecto de los espectros CIP-ME. Esto sugiere que la permeación de CIP estaría más limitada cuando se encuentra en un medio no-organizado (CIP-NO), con respecto a CIP cargado en una microemulsión (CIP-ME). Sin embargo, se puede apreciar que CIP alcanza el valor máximo de señal más rápidamente en CIP-NO que en CIP-ME, para luego hacerse relativamente constante.

A continuación, se realizó un estudio cuantitativo para determinar la concentración de CIP en función del tiempo de permeación. La ecuación de regresión

correspondiente a la curva de calibración obtenida para la cuantificación de CIP en la solución aceptora fue I = 18,44 [CIP L^{-1} mg] c + 11,68, donde I representa la intensidad de fluorescencia (unidades arbitrarias) y c es la concentración de ciprofloxacina en mg L^{-1}, siendo el coeficiente de determinación (R^2) de 0,9910. Los espectros de fluorescencia molecular correspondientes a los testigos de CIP y la curva de calibrado se muestran en la Figura 3.9A y 3.9B, respectivamente. Entonces, a partir de esto fue posible calcular la concentración de CIP en la solución aceptora a lo largo de cada tiempo, y con ello trazar los perfiles de permeación tanto para CIP-NO como para CIP-ME, los cuales pueden observarse en la Figura 3.10. En ambos medios, CIP presentó una fase inicial con mayor permeación, seguida de una etapa de permeación sostenida. No obstante, la permeabilidad de CIP-NO a través de la membrana resultó ser considerablemente menor en comparación con la de CIP-ME. En la Tabla 3.1 se presentan las ecuaciones de ajuste logarítmico (ln) para los perfiles de permeación de CIP-NO y CIP-ME, junto con sus respectivos valores de coeficientes de determinación (R^2). Estos resultados indicaron que la permeación de CIP, tanto en un medio no-organizado como cargado en la microemulsión, siguió una cinética de orden cero.

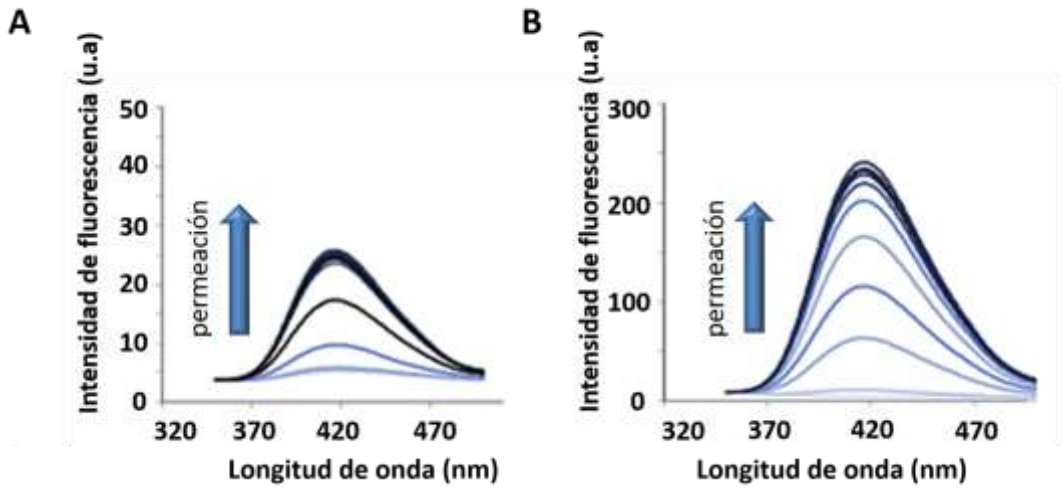


Figura 3.8. Espectros de emisión de fluorescencia molecular obtenidos a lo largo del proceso de permeación (90 min) correspondientes a: A) CIP en un medio no-organizado (CIP-NO) y B) CIP cargada en la microemulsión propuesta (CIP-ME). Las flechas indican el aumento de la señal a lo largo del tiempo debido al aumento de la concentración de CIP en la solución aceptora.

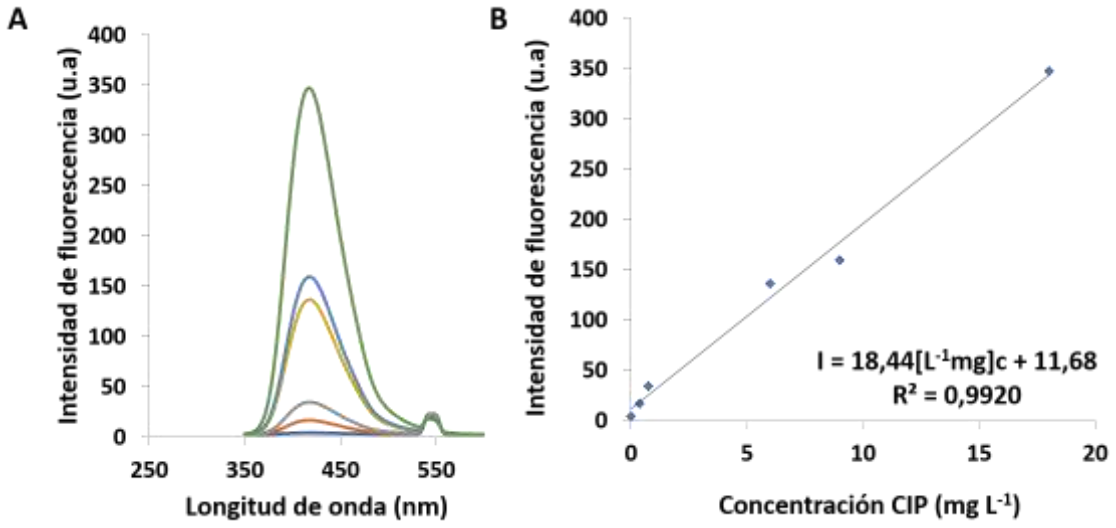


Figura 3.9. A) Espectros de fluorescencia molecular de las soluciones testigos de CIP cuya máxima intensidad de fluorescencia se registró a 417 nm. B) Curva de calibrado de CIP en un rango de concentraciones entre 0,37 - 18,00 mg L^{-1}. Cada experimento fue realizado por triplicado (n = 3).

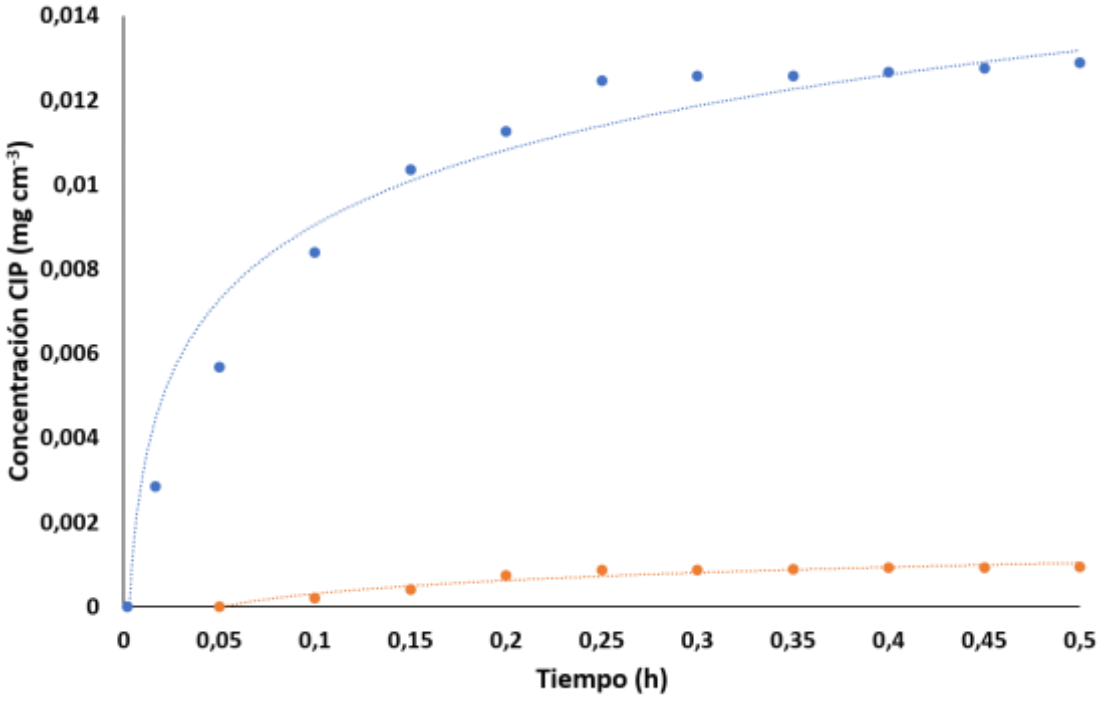


Figura 3.10. Perfiles de permeación obtenidos para CIP cuando se encuentra en un medio no-organizado (CIP-NO; naranja) y en la microemulsión propuesta (CIP-ME; azul) luego de un ajuste logarítmico (ln) de la concentración de CIP en función del tiempo. Los puntos representan el valor promedio de tres determinaciones (n=3).

Tras definir los modelos de ajuste y determinar la cinética del proceso de permeación se calcularon las correspondientes constantes cinéticas de permeación (*Kp*) para CIP utilizando la Ecuación 3.2:

$$Kp = \frac{Q}{At(C0-Ci)} \qquad \text{Ecuación 3.2}$$

donde Q (mg) representa la cantidad de compuesto que difunde a través de la membrana en un tiempo t (h), A corresponde al área expuesta de la membrana expresada en cm^2, mientras que C_0 y C_i son las concentraciones del compuesto en el compartimento donador y aceptor expresada en mg cm^{-3}, respectivamente. Por lo general, C_i se considera nula.

Tabla 3.1 Modelos y parámetros de ajuste para los perfiles de permeación de CIP en CIP-NO y en CIP-ME junto con las correspondientes constantes de permeación (n = 3).

	Ecuación de ajuste	**R^2**	***Kp* (cm h^{-1})**
CIP-NO	c = 0,0005 ln (t) + 0,0014	0,9326	$5{,}30 \times 10^{-5} \pm 5{,}0 \times 10^{-7}$
CIP-ME	c = 0,0026 ln (t) + 0,0149	0,9546	$2{,}76 \times 10^{-4} \pm 9{,}0 \times 10^{-6}$

Como puede verse en la Tabla 3.1, los valores de *Kp* calculados para CIP-NO y CIP-ME sugieren que la difusión a través de la membrana de CIP en CIP-NO fue significativamente menor en contraste con CIP en CIP-ME (p = 0,05).

3.4.3.3 Estudio de la permeación de CIP-ME a lo largo del tiempo

Adicionalmente, se evaluaron los perfiles de permeación de CIP-ME a lo largo del tiempo, determinando los valores de *Kp* tras 1, 15 y 30 días de almacenamiento de la microemulsión conservada al abrigo de la luz y a 25°C los cuales resultaron 2,76 x 10^{-4} cm h^{-1}, 1,80 x 10^{-4} cm h^{-1} y 1,38 x 10^{-4} cm h^{-1}, respectivamente. Tal como se muestra en la Figura 3.11, el perfil de permeación de CIP disminuyó progresivamente con el tiempo,

observándose el menor valor de *Kp* de CIP-ME en el día 30. No obstante, en todos los casos los valores de *Kp* obtenidos fueron mayores que CIP en un medio no-organizado (CIP-NO), el cual resultó ser 5,30 x 10^{-5} cm h^{-1} y no varió a lo largo de los días. Probablemente esto se deba a que CIP logre establecerse definitivamente en la interfase de la microemulsión con el paso de los días, lo que genera cambios en su cinética de difusión a través de la membrana.

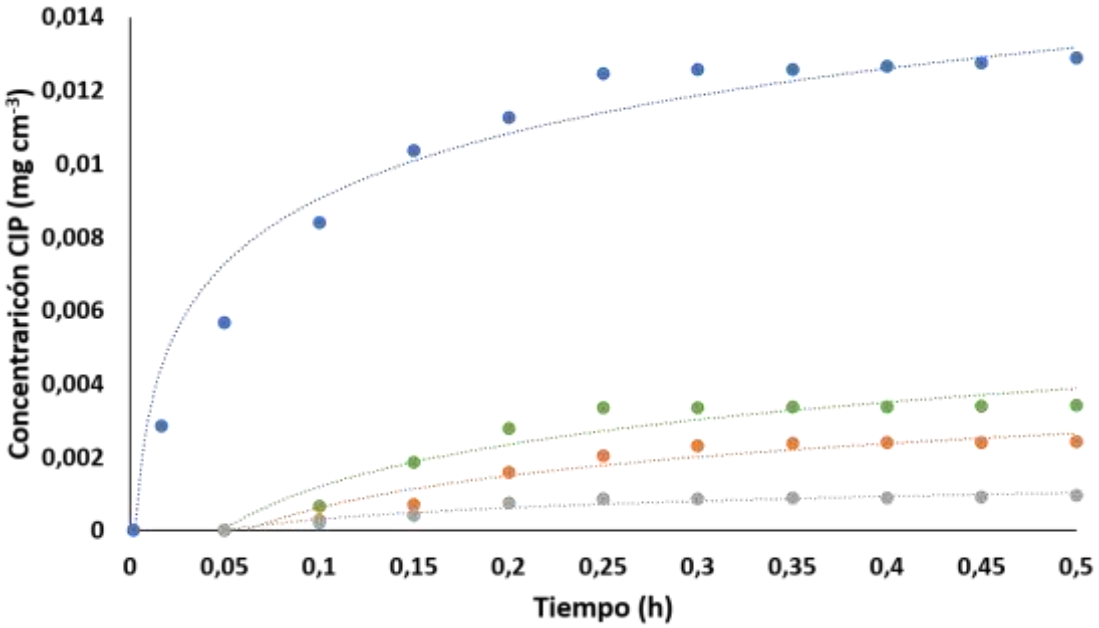


Figura 3.11. Perfiles de permeación obtenidos y valores de *Kp* correspondientes a CIP en CIP-ME luego de 1 día (azul), 15 días (verde) y 30 días (naranja) de almacenamiento de la formulación al abrigo de la luz y a 25°C. Además, se muestra el perfil de CIP-NO (gris) el cual no mostró diferencias a lo largo de los días. Los puntos representan el valor promedio de tres determinaciones (n=3).

3.4.4 Estudio de la actividad antibacteriana

A modo de investigar la actividad antibacteriana de la formulación CIP-ME, en primer lugar se determinó la concentración mínima que inhibe el crecimiento de la cepa *S. aureus* Newman. El valor de CIM de la formulación CIP-ME obtenido fue 375 µg mL^{-1}.

Posteriormente, se evaluó la capacidad de la formulación CIP-ME para alterar los biofilms previamente formados mediante el método de tinción con violeta cristal. Como se muestra en la Figura 3.12, la biomasa de los biofilms disminuyó significativamente por el tratamiento con la formulación CIP-ME en comparación con las observadas en el grupo

tratado con la microemulsión sin carga (ME) y el grupo control (sin ningún tratamiento). La exposición a CIP-ME destruyó el 54% de los biofilms ya formados. Como se ha comentado anteriormente, el método cristal violeta evalúa la biomasa del biofilm, es decir, la comunidad bacteriana junto con su matriz extracelular (exopolisacáridos, proteínas y ADN extracelular). Por tanto, este método resultó adecuado para evaluar la destrucción de biopelículas, aunque no los efectos bactericidas de CIP-ME[195].

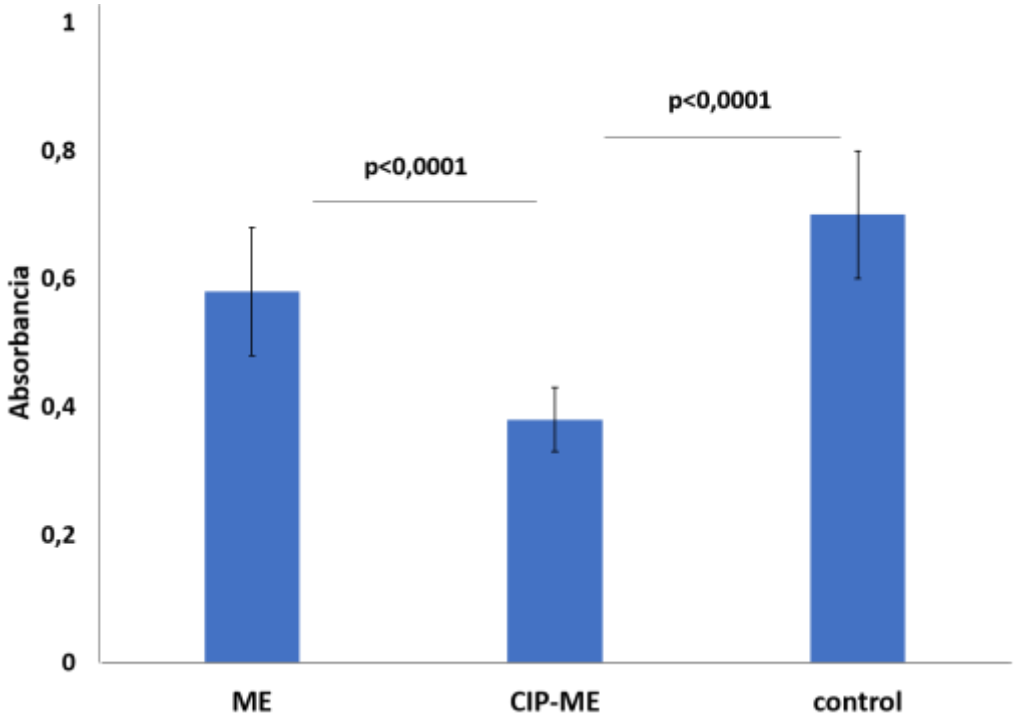


Figura 3.12. Resultados del estudio de actividad anti-biofilm de la microemulsión sin carga (ME) y de la formulación CIP-ME. Como control se utilizó una cepa de *S. aureus* sin tratamiento. Cada barra representa la media con su correspondiente desviación estándar de 6 pocillos de 3 experimentos independientes. Los biofilms fueron cuantificados espectrofotométricamente por tinción con violeta cristal. Las líneas horizontales muestran las comparaciones estadísticas. P <0,0001 se consideraron significativas (prueba de Mann-Whitney).

3.4.5 Estudios de eficacia terapéutica *in-vivo* mediante un modelo murino

3.4.5.1 Colonización nasal

[195] Pitts, B., Hamilton, M. A., Zelver, N., & Stewart, P. S. (2003). A microtiter-plate screening method for biofilm disinfection and removal. *Journal of microbiological methods*, *54*(2), 269-276.

S. aureus puede residir en la mucosa nasal humana y murina formando biopelículas[196,197,198]. En humanos, entre el 20% y el 50% de la población sana está colonizada en las fosas nasales por *S. aureus*[199]. El efecto de CIP-ME sobre la colonización nasal de *S. aureus* se evaluó en un modelo murino. El número de bacterias viables recuperadas de la nariz de ratones tratados con CIP-ME resultó $1,2 \times 10^3$ UFC mL^{-1}, un valor que fue significativamente menor (prueba de Mann-Whitney; p = 0,04) que los correspondientes a la microemulsión sin carga (ME), el cual fue $2,8 \times 10^4$ UFC mL^{-1}, y que el grupo control el cual presentó $4,7 \times 10^4$ UFC mL^{-1}. Tal como puede observarse en la Figura 3.13, los resultados muestran que el tratamiento con CIP-ME provocó una reducción significativa de la colonización nasal de *S. aureus* en ratones.

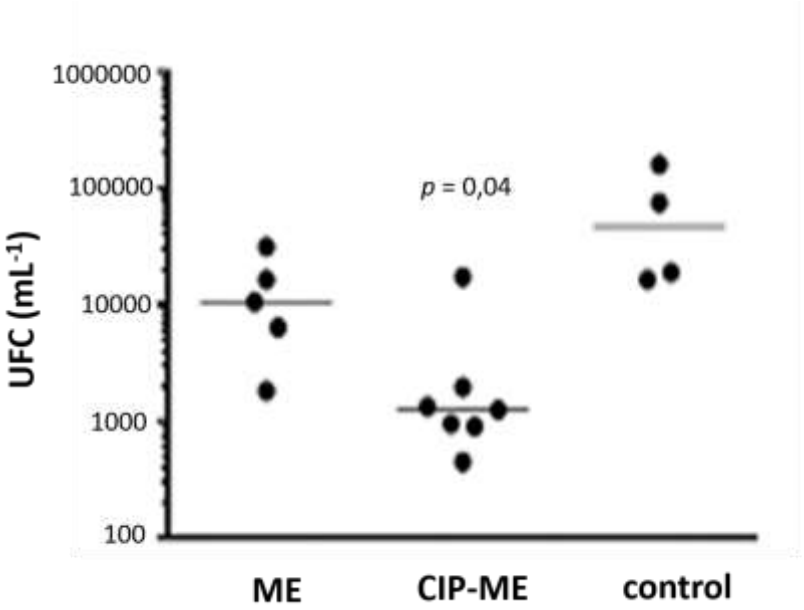


Figura 3.13. Resultados del estudio de colonización nasal por *S. aureus* en un modelo murino. Cada punto corresponde a un ratón individual. Las líneas horizontales representan el valor medio de UFC mL^{-1} en las fosas nasales. Comparación entre el grupo tratado con microemulsión sin carga (ME), CIP-ME y el grupo control (prueba de Mann-Whitney; p = 0,04).

[196] Zernotti, M. E., Angel Villegas, N., Roques Revol, M., Baena-Cagnani, C. E., Arce Miranda, J. E., Paredes, M. E., ... & Paraje, M. G. (2010). Evidence of bacterial biofilms in nasal polyposis. *Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology*, *20*(5), 380-385.
[197] Muthukrishnan, G., Quinn, G. A., Lamers, R. P., Diaz, C., Cole, A. L., Chen, S., & Cole, A. M. (2011). Exoproteome of Staphylococcus aureus reveals putative determinants of nasal carriage. *Journal of proteome research*, *10*(4), 2064-2078.
[198] Reddinger, R. M., Luke-Marshall, N. R., Hakansson, A. P., & Campagnari, A. A. (2016). Host physiologic changes induced by influenza A virus lead to Staphylococcus aureus biofilm dispersion and transition from asymptomatic colonization to invasive disease. *MBio*, *7*(4), 10-1128.
[199] Mulcahy, M. E., & McLoughlin, R. M. (2016). Host–bacterial crosstalk determines Staphylococcus aureus nasal colonization. *Trends in microbiology*, *24*(11), 872-886.

3.4.5.2 Infección cutánea

Como ya se ha mencionado, *S. aureus* es un patógeno comensal que suele encontrarse de manera habitual en la piel, las fosas nasales y las mucosas de individuos sanos. Este patógeno es el principal microorganismo aislado en cultivos de infecciones de piel y tejidos blandos[200,201]. Además, *S. aureus* posee una gran capacidad para desarrollar resistencia a los antimicrobianos, ya sea por mutaciones o a través de transferencia horizontal de genes de resistencia desde otras bacterias[202]. Desde la década de 1960, se han identificado cepas de *S. aureus* resistentes a la meticilina (MRSA) en pacientes hospitalizados, y a partir de la década de 1990, su presencia comenzó a extenderse en la comunidad[203]. Posteriormente, a partir del año 2000, se ha registrado un incremento global en las infecciones de piel y tejidos blandos causadas por *S. aureus*, vinculado a la propagación de las cepas de MRSA adquirido en la comunidad[204]. Por ello, las infecciones causadas por las cepas de MRSA son más difíciles de tratar y ello plantea un aumento de los costos en los sistemas sanitarios[205] lo que motiva el desarrollo de nuevos tratamientos eficaces contra este patógeno[206]. En nuestro caso, se evaluaron los efectos de CIP-ME sobre la piel de ratones infectados por *S. aureus* y los resultados se muestran en la Figura 3.14. Luego de 24 h de la infección por *S. aureus* se observa una reducción visible de las lesiones y del eritema en el área afectada cuando los ratones son

[200] Linz, M. S., Mattappallil, A., Finkel, D., & Parker, D. (2023). Clinical impact of Staphylococcus aureus skin and soft tissue infections. *Antibiotics*, *12*(3), 557.
[201] Moran, G. J., Krishnadasan, A., Gorwitz, R. J., Fosheim, G. E., McDougal, L. K., Carey, R. B., & Talan, D. A. (2006). Methicillin-resistant S. aureus infections among patients in the emergency department. *New England Journal of Medicine*, *355*(7), 666-674.
[202] Grundmann, H., Aires-de-Sousa, M., Boyce, J., & Tiemersma, E. (2006). Emergence and resurgence of meticillin-resistant Staphylococcus aureus as a public-health threat. *The lancet*, *368*(9538), 874-885.
[203] Tenover, F. C., McDougal, L. K., Goering, R. V., Killgore, G., Projan, S. J., Patel, J. B., & Dunman, P. M. (2006). Characterization of a Strain of Community-AssociatedMethicillin-Resistant Staphylococcus Aureus WidelyDisseminated in the UnitedStates. *Journal of clinical microbiology*, *44*(1), 108-118.
[204] Miller, L. G., Eisenberg, D. F., Liu, H., Chang, C. L., Wang, Y., Luthra, R., ... & Suaya, J. A. (2015). Incidence of skin and soft tissue infections in ambulatory and inpatient settings, 2005–2010. *BMC infectious diseases*, *15*, 1-8.
[205] Paharik, A. E., Parlet, C. P., Chung, N., Todd, D. A., Rodriguez, E. I., Van Dyke, M. J., ... & Horswill, A. R. (2017). Coagulase-negative staphylococcal strain prevents Staphylococcus aureus colonization and skin infection by blocking quorum sensing. *Cell host & microbe*, *22*(6), 746-756.
[206] Tatarkiewicz, J., Staniszewska, A., & Bujalska-Zadrożny, M. (2016). New agents approved for treatment of acute staphylococcal skin infections. *Archives of Medical Science*, *12*(6), 1327-1336.

tratados con CIP-ME (Figura 3.14.A) respecto a los ratones del grupo control, que presentaron lesiones ulceradas y eritematosas con escaso exudado al momento del tratamiento con PBS (Figura 3.14B).

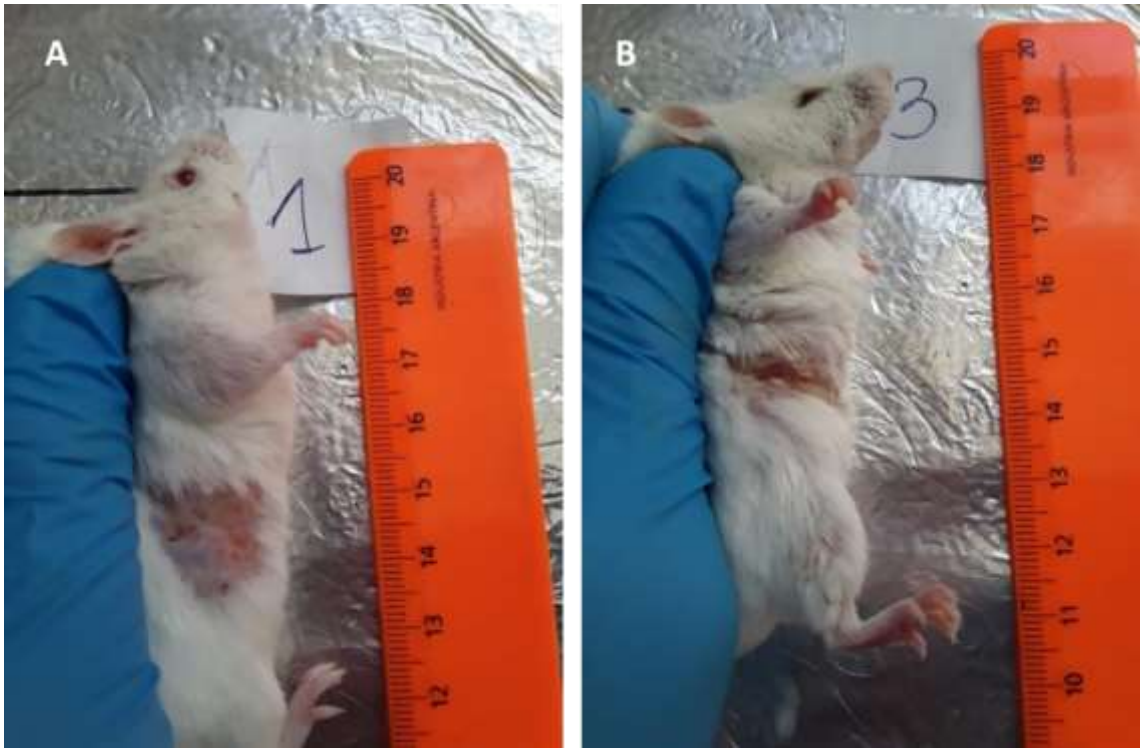


Figura 3.14. Ensayo murino de infección cutánea utilizando la cepa de *S.aureus* MW2. A) Fotografía representativa de lesiones correspondientes a ratones infectados con *S. aureus* y posteriormente tratados con 100 µL de CIP-ME. B) Fotografía representativa de las lesiones correspondientes a ratones del grupo control (ratones infectados con *S. aureus* y tratados con 100 µL de PBS).

Por otro lado, como se ve en la Figura 3.15, el número de bacterias viables recuperadas de la piel de los ratones tratados con CIP-ME fue significativamente menor que el de los grupos control (prueba de Mann-Whitney; $p = 0,026$). La comparación entre el grupo control infectado y el grupo tratado con la microemulsión sin cargar (ME) no fue estadísticamente significativo (prueba de Mann-Whitney; $p = 0,15$), lo que demostró que el tratamiento con CIP-ME provocó una reducción significativa de la infección en piel por *S. aureus* en ratones, en comparación con el grupo control.

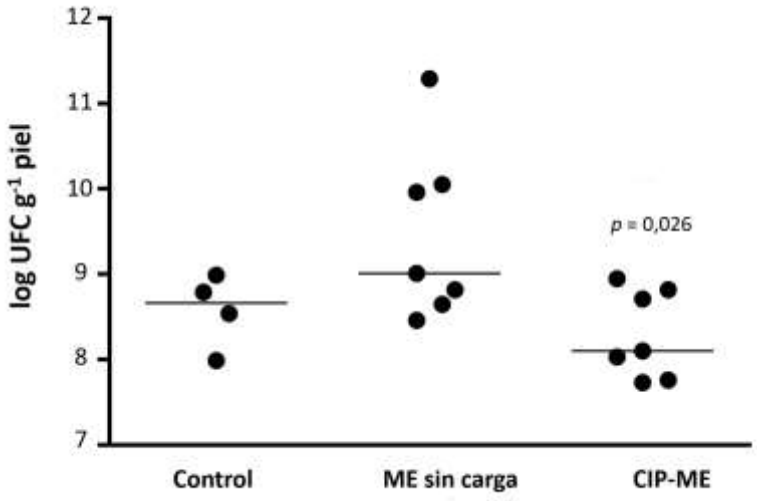


Figura 3.15. Resultados del recuento de UFC luego del tratamiento con ME y CIP-ME correspondiente al estudio de infección cutánea en un modelo murino. Los ratones se infectaron con una suspensión (~ 7 × 10^8 CFU) de *S. aureus* MW2 por vía subcutánea. Cada punto representa un ratón individual. Las líneas horizontales representan el valor medio de log UFC/g piel.

3.5 Conclusiones Parciales

En primer lugar, se logró cargar exitosamente el sistema portador del tipo microemulsión (o/w) propuesto en el Capítulo 2 con el antibiótico de amplio espectro ciprofloxacina, para su potencial uso en el tratamiento de infecciones de la piel y la colonización intranasal causada por el patógeno oportunista *S. aureus*. Como en el caso anterior, la microemulsión se pudo obtener a partir de una adecuada combinación de materiales biocompatibles, accesibles y de bajo costo, y de una manera sencilla, rápida y utilizando un método de baja energía. Los resultados de la caracterización fisicoquímica demostraron que la microemulsión (o/w) cargada con ciprofloxacina presentó un tamaño de gota uniforme en la escala nanométrica, lo que fue corroborado en este caso por microscopía electrónica de transmisión, y un valor de potencial zeta compatible con sistemas estables. La formulación propuesta presentó un valor de pH adecuado para su potencial aplicación tópica e intranasal, y un valor de osmolaridad apropiado para instilación. A su vez, un estudio espectral por espectrometría de fluorescencia molecular demostró que el antibiótico se ubicó en la interfase fase acuosa-fase oleosa, lo que resultó razonable dada la solubilidad parcial del mismo en agua. Esto además justificó que la

carga efectiva del antibiótico se realizara una vez formada la microemulsión, a diferencia del filtro solar benzofenona-3 el cual debido a su alta liposolubilidad se incorporó a la fase oleosa previo a la formación de la microemulsión. Luego, el estudio de permeación fue llevado a cabo exitosamente utilizando un novedoso sistema automático en línea con detección fluorescente acoplado a una celda de difusión de Franz tradicional, el que permitió obtener información del proceso dinámico de permeación en tiempo real. Además, el procedimiento analítico estuvo comandado por software y evitó el uso de solventes orgánicos comúnmente utilizados en la metodología tradicional, la cual utiliza técnicas separativas para la cuantificación de los activos de interés. En este caso, se pudo demostrar que la ciprofloxacina presentó una constante de permeación mayor cuando se encontraba en el sistema portador, incluso con el paso de los días, con respecto a su presencia en un medio no-organizado. Esto sugiere que concentraciones adecuadas y sostenidas del antibiótico cargado en la microemulsión podrían permear de manera más eficiente con el tiempo a través de la piel y las mucosas para alcanzar la eficacia terapéutica en el sitio de la infección. Por último, los estudios *in-vitro* e *in-vivo* de actividad antimicrobiana demostraron que la formulación propuesta logró interrumpir biofilms previamente formados y disminuir la colonización nasal por *S. aureus* en un modelo murino. Por ello, dicha formulación podría ser adecuada para sustituir parcial o totalmente el tratamiento oral tradicional con ciprofloxacina, evitando así su propagación por el torrente sanguíneo y reduciendo sus efectos secundarios sistémicos.

Capítulo 4

Microemulsión basada en activos naturales con capacidad antioxidante y antiviral frente a betacoronavirus y alfaherpesvirus bovino 1

4.1 Objetivos

Desarrollar una microemulsión (o/w) basada en componentes naturales con actividad biocida, y portadora del antioxidante quercetina, para el tratamiento tópico de infecciones virales causadas por betacoronavirus bovino y alfaherpesvirus bovino 1 en el ganado, a partir de materiales biocompatibles y aceptados por la normativa vigente para uso animal. Obtener y caracterizar fisicoquímicamente la microemulsión propuesta, llevar a cabo estudios analíticos para evaluar la permeación utilizando un sistema miniaturizado, y abordar estudios *in-vitro* para la determinación de la actividad antiviral como potencial indicador de su eficacia terapéutica.

4.2 Introducción

El betacoronavirus bovino (BCoV) es un agente patógeno que afecta considerablemente el ganado bovino, siendo el síndrome diarreico neonatal, la disentería en animales adultos y la infección respiratoria los síntomas más característicos[207]. El BCoV se transmite principalmente por vía fecal-oral y respiratoria. Los terneros recién nacidos son especialmente vulnerables, ya que pueden infectarse al ingerir calostro o leche contaminada, o al estar en contacto con superficies o animales infectados. Además, el hacinamiento y las malas condiciones de higiene en los sistemas de crianza intensivos facilitan la propagación del virus[208]. A su vez, BCoV es considerado un patógeno primario, capaz de debilitar la inmunidad innata de las vías respiratorias del ganado, lo que facilita la sobreinfección por bacterias oportunistas dando lugar al *complejo respiratorio bovino*, una patología respiratoria de origen multifactorial que suele involucrar infecciones bacterianas secundarias generando así pérdidas económicas significativas en la producción ganadera[209,210]. En nuestro país, la prevalencia del BCoV varía según la región y el sistema de producción. A modo de ejemplo, un estudio realizado en el Valle de Lerma, provincia de Salta, Argentina, detectó BCoV en el 0,41% de las muestras de terneros de tambos y en el 1,71% de los terneros con diarrea, demostrando una tasa de prevalencia similar a la de otras regiones del país[211].

Por otro lado, el alfaherpesvirus bovino 1 (BoHV-1) es un agente infeccioso que puede producir en el ganado la *rinotraqueitis infecciosa bovina*, una enfermedad altamente contagiosa, capaz de producir alteraciones en el sistema respiratorio y reproductivo de los animales[212]. Además, la infección por este virus es una de las causas

[207] Saif, L. J. (2004), Animal coronaviruses: what can they teach us about the severe acute respiratory syndrome. *Rev. sci. tech. Off. Int. Epiz. 23*, (2): 643-660.
[208] Martell, A. B., Batista, E. R., & Valle, M. B. (2006). Coronavirus bovino: Infecciones neumoentéricas. REDVET. *Revista Electrónica de Veterinaria*, *7*(12), 1-28.
[209] Gamietea, I. J. Ganadería bovina en el área de influencia de la EEA San Pedro. Recomendaciones sobre sanidad, nutrición y manejo. Mayo 2019.
[210] De Yaniz, G., Fiorentino, A., Quintana, S., Cheuquepan, F., Marin, M. S., Perez, S., ... & Sanchez Bruni, S. F. (2021). Detección de coronavirus bovino asociado al complejo respiratorio bovino. Primer reporte en argentina.
[211] Bertoni, E., Bok, M., Aduriz, M. A., Miño, S., Cimino, R. O., Vega, C. G., & Parreño, V. (2019). Primer reporte del análisis molecular de Rotavirus Grupo A y Coronavirus en terneros de leche y cría en el Valle de Lerma de la provincia de Salta.
[212] Jones, C. (2003). Herpes simplex virus type 1 and bovine herpesvirus 1 latency. *Clinical microbiology reviews*, *16*(1), 79-95.

principales de aborto en el ganado[213]. El BoHV-1 es fácilmente transmisible a partir del contacto estrecho entre animales infectados, ya sea a través de secreciones nasales y oculares, mediante contacto sexual o por transmisión de la madre al feto, provocando abortos[214,215]. En nuestro país, BoHV-1 es considerado un virus endémico con una prevalencia del 84,1% según reportes del año 2018, lo que provoca un gran impacto económico para los sistemas de producción ganadera[216].

La prevención de las enfermedades causadas por ambos virus generalmente incluye el uso de vacunas. Sin embargo, en el caso de BoHV-1 estas no han podido prevenir la infección latente e incluso se han registrado casos que las asocian con actividad abortigénica[217]. Además, en ambos casos, el uso de las vacunas ha logrado reducir las manifestaciones clínicas, pero no han podido proteger completamente de la infección[218,219]. Por lo tanto, un tratamiento coadyuvante que permita controlar o reducir las infecciones sin ocasionar efectos perjudiciales en el ganado sería una buena estrategia de prevención y control de estas enfermedades.

Como se mencionó en capítulos anteriores, las microemulsiones son plataformas versátiles capaces de administrar activos terapéuticos tanto de forma local como sistémica[220]. Incluso, debido a la alta estabilidad físicoquímica que estos sistemas poseen, es posible diluir las microemulsiones para facilitar la administración sin perder sus propiedades originales[221]. Hasta el momento se han desarrollado microemulsiones para

[213] Maidana, S.S., Marin, M., Destefano, G., Combessies, G. Romera, S.A., (2018) Herpesvirus bovino 1 (BoHV-1): actualización de las cepas circulantes en Argentina, *Rev vet 29* (1): 52-56.
[214] Muylkens, B., Thiry, J., Kirten, P., Schynts, F., & Thiry, E. (2007). Bovine herpesvirus 1 infection and infectious bovine rhinotracheitis. Veterinary research, 38(2), 181-209.
[215] MacLachlan, N.; Dubovi, E. (2017). Herpesvirales, Fenner's Veterinary Virilogy. 5ᵗᴴ edition, 189-216.
[216] Soto, J., Perez, S., Lucchesi, E., Forletti, A., & Soto, P. (2018). Diagnóstico serológico de la infección por BoHV-1 y BVDV en bovinos inmunizados con vacunas reproductivas.
[217] Miller J.M., Whetstone C.A., Bello, L.J., Lawrence,W.C., (1991), Determination of ability of a thymidine kinasenegative deletion mutant of bovine herpesvirus-1 to cause abortion in cattle. *Am J Vet Res 52*, (7) 1038-1043.
[218] Boka, M., Alassia, M., Frankc, F., Vega, C.G, Wigdorovitz, A., Parreno, V., (2018) Passive immunity to control Bovine coronavirus diarrhea in a dairy herd in Argentina, *Rev. Argen. Microbiol. 50* (1), 23-30.
[219] Muylkens, B., Thiry, J., Kirten, P., Schynts, F., Thiry, E., 2007, Bovine herpesvirus 1 infection and infectious bovine rhinotracheitis. *Vet Res 38*, 181-209.
[220]Ansari, M.J., Kohli, K., Dixit, N., (2008) Microemulsions as potential drug delivery systems: a review, PDA J. Pharm. Sci.Technol. 62 (1) 66-79.
[221] Wang, W., Hongtu, W., Du,Z., Tai, X., Wang, G., (2015) Formation and Characterization of Fully Dilutable Microemulsion with Fatty Acid Methyl Esters as Oil Phase, *ACS Sustainable Chem. Eng. 3*, 443−450.

el tratamiento de un amplio espectro de infecciones virales. Alkhatib y col.[222] propusieron una microemulsión compuesta por MIP (50,6% p/p) como fase oleosa, TW80 (24,2% p/p) y Span 20 (16,6% p/p) como surfactantes, ET y agua (3:2) como fase acuosa, y evaluaron la eficacia antiviral de esta formulación obteniendo una significativa actividad frente al virus herpes simplex tipo 2 (HSV-2). Es importante destacar que en este caso no hubo un componente activo específico, siendo en sí la microemulsión quien presentó la actividad antiviral. Sasivimolphan y col.[223] desarrollaron una microemulsión compuesta por un 10,0% (p/p) de MIP, 35,0% (p/p) de TW80, 35,0% (p/p) de alcohol isopropílico y 20,0% (p/p) de agua, en la que posteriormente incorporaron oxiresveratrol en concentraciones del 20,0% al 30,0% (p/p). La formulación fue evaluada frente a infecciones cutáneas provocadas por el virus del herpes simple tipo 1 (HSV-1) en un modelo murino. Los resultados demostraron que las microemulsiones cargadas con oxiresveratrol al 25% y 30% (p/p) presentaron una eficacia antiviral comparable a la de una crema con aciclovir al 5,0% (p/p), aplicada tópicamente cinco veces al día, teniendo en cuenta que el fármaco aciclovir es un agente antiviral frecuentemente usado para tratar tópicamente infecciones por HSV-1. En este sentido, Kumar y col.[224] diseñaron microemulsiones tipo (o/w) para la administración transdérmica de aciclovir. Para ello, seleccionaron ácido oleico: aceite de ricino (3:1), TW80 y ET como fase oleosa, surfactante y co-surfactante, respectivamente, llegando a la conclusión que las microemulsiones obtenidas se pueden utilizar como sistema de administración transdérmica de fármacos poco solubles en agua siendo la formulación óptima la que estuvo compuesta por 5% de fase oleosa, 15% de TW80, 30% de ET y 50% de agua.

Por lo anteriormente expuesto, las microemulsiones surgen como una herramienta promisoria para el tratamiento de afecciones virales. Sin embargo, hasta el momento no se han reportado trabajos en los que se utilicen estos sistemas como portadores de componentes con actividad antiviral contra BCoV y BoHV-1.

---

[222] Alkhatib, M. H., Aly, M. M., Rahbeni, R. A., & Balamash, K. S. (2016). Antimicrobial activity of biocompatible microemulsions against Aspergillus niger and herpes simplex virus type 2. *Jundishapur Journal of Microbiology*, *9*(9), e37437.

[223] Sasivimolphan, P., Lipipun, V., Ritthidej, G., Chitphet, K., Yoshida, Y., Daikoku, T., ... & Shiraki, K. (2012). Microemulsion-based oxyresveratrol for topical treatment of herpes simplex virus (HSV) infection: physicochemical properties and efficacy in cutaneous HSV-1 infection in mice. *Aaps Pharmscitech*, *13*, 1266-1275.

[224] Kumar, B., Jain, S. K., Prajapati, S. K., Mahor, A., & Kumar, A. (2010). Development and characterization of transdermal microemulsion gel for an antiviral drug. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research, 1*(6), 57-74.

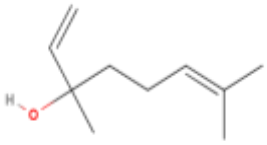
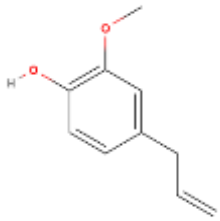
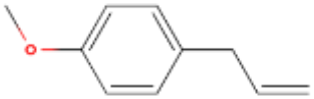
Por otro lado, se han realizado numerosas investigaciones con el objetivo de obtener medicamentos y/o tratamientos que minimicen los efectos secundarios y sean amigables con el ambiente. Por esta razón, las hierbas medicinales y sus metabolitos o extractos surgen como una atractiva alternativa ya que proveen múltiples efectos terapéuticos que pueden resultar beneficiosos para la salud. Se ha demostrado que los productos naturales de origen vegetal, y sus derivados, presentan actividad antimicrobiana, antiviral y antioxidante, entre otras. En nuestro país, la Farmacopea Argentina define como droga vegetal a las plantas o sus partes enteras, molidas o pulverizadas (flores, frutos, semillas, tubérculos, cortezas, etc.) frescas o secas, así como los jugos, gomas, látex, aceites esenciales o fijos y otros componentes similares, que se emplean puras o mezcladas en la elaboración de medicamentos[225].

En particular, los aceites esenciales (AEs) de ciertas plantas y hierbas se han utilizado a lo largo de los años con fines medicinales y de salud, ya sea en la industria alimenticia como en la farmacéutica y/o cosmética. A modo general, los AEs son líquidos oleosos complejos que se pueden obtener a partir de la extracción de diversas partes de las plantas (hojas, semillas, corteza e incluso frutos) a través de diversos métodos, siendo la hidrodestilación y la destilación al vapor los más utilizados. Químicamente los AEs son una mezcla de componentes volátiles producidos por el metabolismo secundario de plantas aromáticas y otras variedades siendo sus constituyentes principales los terpenos volátiles y los hidrocarburos[226]. En particular, el aceite esencial de albahaca (AEA) se obtiene a partir de la planta *Ocimum basilicum*, comúnmente denominada albahaca dulce. Esta hierba aromática se ha utilizado a lo largo de los años en la gastronomía e industria alimenticia debido a sus propiedades organolépticas, pero también algunas culturas la han utilizado con fines medicinales debido a sus propiedades terapéuticas. El AEA es un líquido ligeramente amarillento de olor característico que presenta una compleja composición química rica en componentes bioactivos como lo son el estragol, eugenol, limoneno, entre varios otros, capaces de proveer diferentes actividades como antimicrobiana, antiinflamatoria, y antifúngica[227]. Además, se ha reportado que este

[225] Farmacopea Argentina. (2014). Droga vegetal. En *Farmacopea Argentina* (Vol. 1, Sección 630, 7.ª ed., pp. [291]). Sociedad Argentina de Farmacia y Bioquímica.
[226] Ríos, J. L. (2016). Essential oils: What they are and how the terms are used and defined. In *Essential oils in food preservation, flavor and safety* (pp. 3-10). Academic Press.
[227] Shahrajabian, M. H., Sun, W., & Cheng, Q. (2020). Chemical components and pharmacological benefits of Basil (Ocimum basilicum): A review. *International Journal of Food Properties*, *23*(1), 1961-1970.

aceite presenta actividad antiviral frente al virus de la diarrea bovina, debido a la presencia de activos como alcanfor, timol y 1,8-cineol[228]. Por otro lado, se le ha atribuido actividad analgésica y antiinflamatoria por la presencia de estragol y eugenol[229]. En la Tabla 4.1 se observan los principales constituyentes del AEA con sus correspondientes propiedades terapéuticas.

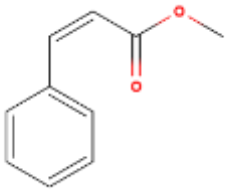
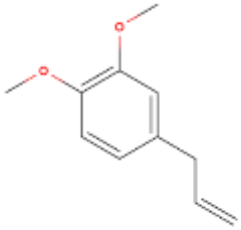
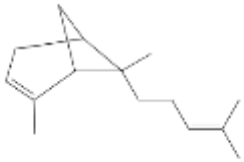
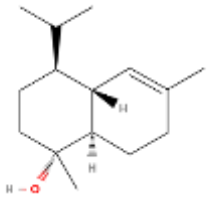
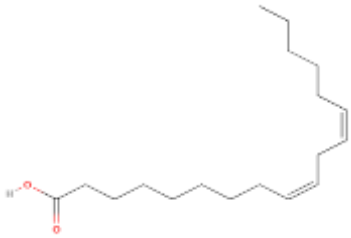
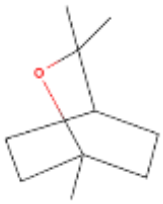
Tabla 4.1. Principales componentes del AEA y sus correspondientes actividades/propiedades terapéuticas. Adaptada de K. Dhama y col.[230]

Compuestos principales	Fórmula molecular	Estructura química	Actividad/Propiedad terapéutica
Linalool	$C_{10}H_{18}O$		analgésico, antiinflamatorio, antimicrobiano, antibacteriano, antiviral, antifúngico, larvicida, antineoplásico, antioxidante, cardioprotector
Eugenol	$C_{10}H_{12}O_2$		analgésico, antiinflamatorio, antimicrobiano, antibacteriano, antiviral, antifúngico, antineoplásico, antioxidante, cardioprotector
Estragol	$C_{10}H_{12}O$		antiinflamatorio, antimicrobiano, antibacteriano, antifúngico

[228] Kubiça, T. F., Alves, S. H., Weiblen, R., & Lovato, L. T. (2014). In vitro inhibition of the bovine viral diarrhoea virus by the essential oil of Ocimum basilicum (basil) and monoterpenes. *Brazilian Journal of Microbiology*, *45*, 209-214.

[229] Rodrigues, L. B., Martins, A. O. B. P. B., Cesário, F. R. A. S., e Castro, F. F., de Albuquerque, T. R., Fernandes, M. N. M., ... & de Menezes, I. R. A. (2016). Anti-inflammatory and antiedematogenic activity of the Ocimum basilicum essential oil and its main compound estragole: In vivo mouse models. *Chemico-biological interactions*, *257*, 14-25.

[230] Dhama, K., Sharun, K., Gugjoo, M. B., Tiwari, R., Alagawany, M., Iqbal Yatoo, M., ... & Farag, M. R. (2023). A comprehensive review on chemical profile and pharmacological activities of Ocimum basilicum. *Food Reviews International*, *39*(1), 119-147.

Metil cinamato	$C_{10}H_{10}O_2$		antiinflamatorio, antifúngico, antioxidante
Metil eugenol	$C_{11}H_{14}O_2$		antiinflamatorio, antiulceroso
α-bergamoteno	$C_{15}H_{24}$		antiinflamatorio, antioxidante
α-cadinol	$C_{15}H_{26}O$		antiinflamatorio, antioxidante
ácido linoleico	$C_{18}H_{32}O_2$		antiinflamatorio, antioxidante
1,8-cineol	$C_{10}H_{18}O$		antibacteriano, antiulceroso

Otro compuesto de origen natural y con múltiples propiedades terapéuticas es la quercetina (QE), un polifenol cuya estructura podemos observar en la Figura 4.1. Este flavonoide habitualmente se puede encontrar en frutas tales como manzanas y frutos

rojos, y en vegetales como por ejemplo cebolla y diversas hojas verdes[231]. Con los años, se han atribuido muchas propiedades a este compuesto, incluyendo su actividad neuroprotectora[232], antiinflamatoria[233], antiaterogénica[234], antiviral[235], antimicrobiana[236] y antioxidante[237]. Además, la quercetina ha sido denominada, según la FDA (del inglés, *Food and Drugs Administration*) de Estados Unidos, como un compuesto "GRAS" (del inglés, *generally recognized as safe*)[238]. Sin embargo, la quercetina presenta desventajas tales como su baja penetración en la piel, su baja solubilidad en agua y su inestabilidad a la luz, pH y la temperatura[239]. Por todas estas razones, resultan necesarias nuevas estrategias de vehiculización para la aplicación tópica de este compuesto, siendo un sistema tipo microemulsión un medio promisorio para este fin.

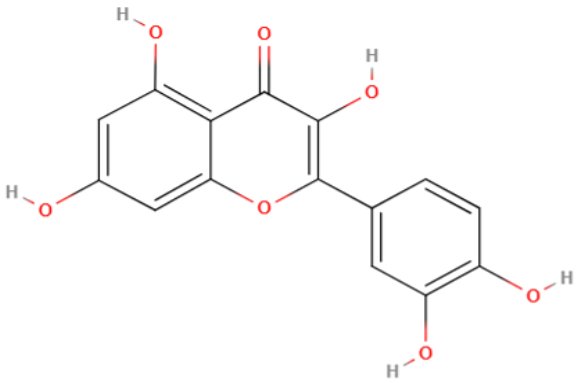


Figura 4.1. Estructura química del flavonoide quercetina (QE).

[231] Sultana, B., & Anwar, F. (2008). Flavonols (kaempeferol, quercetin, myricetin) contents of selected fruits, vegetables and medicinal plants. *Food chemistry*, *108*(3), 879-884.
[232] Khan,H., Ullah, H., Aschner, M., Cheang, W.S., Akkol, E.A., (2020) Neuroprotective Effects of Quercetin in Alzheimer's Disease, *Biomolecules 10* (1), 59.
[233] Saeedi-Boroujeni, A., Mahmoudian-Sani, M.R., (2021) Anti-inflammatory potential of Quercetin in COVID-19 treatment, *Journal of Inflammation 18*, 3.
[234] Pashevin D.A, Tumanovska, L.V, Dosenko, V.E, Nagibin, V.S, Gurianova, V.L, Moibenko A.A., (2011) Antiatherogenic effect of quercetin is mediated by proteasome inhibition in the aorta and circulating leukocytes, *Pharmacol Rep. 63* (4) 1009-1018.
[235] Di Petrillo, A., Orrù, G., Fais, A., Fantini M.C., (2022) Quercetin and its derivates as antiviral potentials: A comprehensive review, *Phytother Res. 36* (1) 266–278.
[236] Nguyen, T.L.A., Bhattacharya D., (2022) Antimicrobial Activity of Quercetin: An Approach to Its Mechanistic Principle, *Molecules 27* (8): 2494.
[237] Konrad, M., Nieman, D.C., (2015) Evaluation of Quercetin as a Countermeasure to Exercise-Induced Physiological Stress, Capítulo 10, Lamprecht M, editor. Boca Raton (FL): CRC Press/Taylor & Francis.
[238] Davis J. M, Murphy E. A, Carmichael M. D., (2009) Effects of the dietary flavonoid quercetin upon performance and health. *Curr Sports Med Rep. 8* (4) 206–213.
[239] Lv, X., Liu, T. Ma, H. Tian, Y., Li, L., Zhen, L., Meng, G., Zhang, J., Tang Z., (2017) Preparation of Essential Oil-Based Microemulsions for Improving the Solubility, pH Stability, Photostability, and Skin Permeation of Quercetin, *AAPS PharmSciTech, 18* (8) 3097-3104.

En este capítulo se propone la obtención de una microemulsión (o/w) basada en activos naturales con actividad antiviral frente a BCoV y BoHV-1 y con actividad antioxidante. Para ello se propone la utilización de AEA como fase oleosa y la posterior carga con quercetina. Por otra parte, se propone un nuevo sistema miniaturizado para abordar el estudio de permeación *in-vitro* de la formulación propuesta.

4.3 Parte Experimental

4.3.1 Reactivos y soluciones

Se utilizó agua ultrapura (18 MΩ cm^{-1}) y todos los reactivos utilizados fueron de calidad analítica.

- 1,1-difenil-2-picrilhidrazilo (Sigma-Aldrich®, Estados Unidos).
- Aceite esencial de albahaca (EUMA®, Argentina).
- Ácido ascórbico (Pura Química, Argentina).
- Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolio) (Sigma-Aldrich®, Estados Unidos).
- Cremophor EL (Sigma-Aldrich®, Estados Unidos).
- Dimetilsulfóxido (MP Biomedicals, Estados Unidos).
- Etanol absoluto (Dorwil®, Argentina).
- Quercetina (Sigma-Aldrich®, Estados Unidos).
- Medio Eagle modificado de Dulbecco F12 (Sigma-Aldrich®, Estados Unidos).
- Medio esencial mínimo (Sigma-Aldrich®, Estados Unidos).
- Metanol (Dorwil®, Argentina).
- Suero fetal bovino (Natocor, Argentina).
- Tripsina al 0,05% (Thermofisher Scientific, Estados Unidos).

Se utilizó Cremophor EL y etanol absoluto como surfactante y co-surfactante, respectivamente. Como fase oleosa se utilizó un aceite esencial de albahaca de origen comercial.

El surfactante elegido, Cremophor EL (CR), fue del tipo no-iónico y se obtiene a partir de la reacción del aceite de ricino con óxido de etileno en una relación molar 1:35. Se presenta como un líquido aceitoso amarillo pálido, transparente a temperaturas superiores a 26°C y posee un olor leve pero característico. Su HLB se encuentra en el rango de 12-14 y su pH oscila entre 6,0 y 8,0. La estructura química de CR se observa en la Figura 4.2.

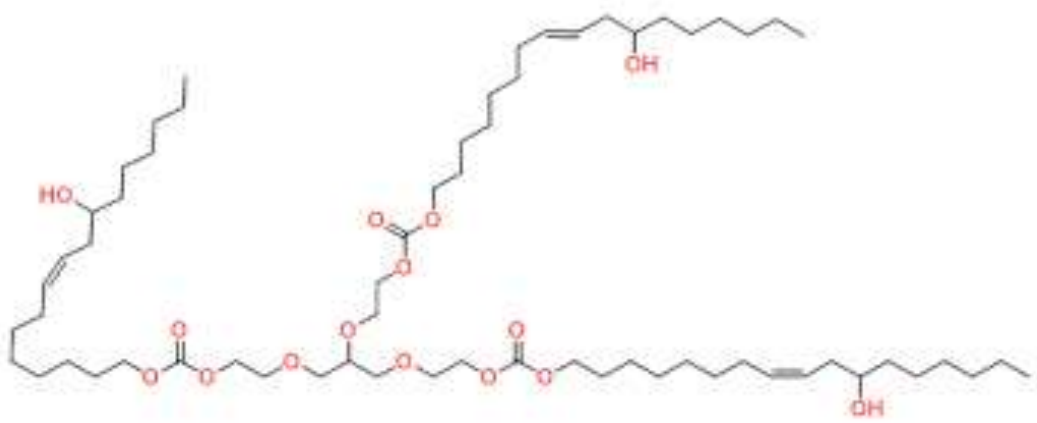


Figura 4.2. Estructura química del macrogolglicerol ricinooleato denominado comercialmente Cremophor EL (CR).

Las características químicas y propiedades del resto de los componentes (aceite esencial de albahaca y quercetina) fueron descritas en secciones anteriores (sección 4.2).

La solución aceptora consistió en una mezcla etanol absoluto:agua (1:1).

Los medios de cultivo empleados se prepararon según las especificaciones del fabricante. Para la realización de los ensayos virales se emplearon placas de cultivo celular de 96 pocillos (Greiner BioOne®, Austria).

4.3.2 Obtención de microemulsiones

Con el objetivo de establecer la proporción de componentes adecuada para la formación de microemulsiones se construyeron dos diagramas de fases pseudoternarios

mediante el método de titulación acuosa a 25°C. En cada caso, se emplearon relaciones de peso de CR:ET (Smix) de 1:1 y 2:1. La relación Smix correspondiente se mezcló con el aceite en proporciones de 0,5: 9,5; 1: 9; 2: 8; 3: 7; 4: 6; 5: 5; 7: 3; 8: 2 y 9: 1 (p/p). Posteriormente, cada mezcla de la relación en peso (Smix:AEA) se tituló con agua ultrapura bajo agitación magnética. Las posibles microemulsiones se identificaron mediante inspección visual como sistemas estables y transparentes, y fueron representadas en el correspondiente diagrama, cuyos ejes representan la fase acuosa, la fase oleosa y la mezcla de surfactante:co-surfactante (Smix) en la proporción establecida. En cambio, aquellos sistemas que presentaron turbidez o separación de fases se clasificaron como sistemas bifásicos y no fueron incluidos en los diagramas. Finalmente, los sistemas considerados microemulsiones se conservaron a temperatura ambiente (25°C) y al resguardo de la luz para los posteriores estudios.

La composición de cada mezcla preparada para la construcción de los respectivos diagramas de fases se detalla en el Apéndice II.

4.3.3 Caracterización fisicoquímica de las microemulsiones obtenidas

4.3.3.1 Determinación del tamaño de gota e índice de polidispersidad

Se realizó una dilución 1:10 en agua destilada de cada muestra para obtener los parámetros Z y PdI mediante la técnica DLS, utilizando el instrumento Zetasizer Nanoserie de Malvern® (Malvern, Reino Unido) de la manera que fue descrita en la sección 2.3.3.1, Capítulo 2 (pag. 64).

4.3.3.2 Medición de pH, índice de refracción y conductividad eléctrica

De la misma manera en que fue detallado en la sección 2.3.3.2, Capítulo 2 (pag. 65), la medición de pH y CE se llevó a cabo efectuándose una dilución 1:10 de las muestras y utilizando un medidor de pH marca Orion modelo 710 (Beverly, Estados Unidos) y un conductímetro marca Adwa® modelo AD32 (Szeged, Hungría), respectivamente. Además, el IR se determinó con un refractómetro marca Atago®, modelo RX-5000 (Bellevue, Estados Unidos) utilizando para este caso una gota pura de las microemulsiones como muestra.

4.3.4 Estudio de estabilidad de las microemulsiones

En este caso, se realizó un estudio de estabilidad acelerada que consistió en cuatro ciclos de enfriamiento-calentamiento, variando la temperatura de 4 °C a 40°C en un término de 24 h y durante 4 días consecutivos utilizando una incubadora Hinotek® modelo LRH-70F (Shangai, China). Posteriormente a cada ciclo se evaluó mediante inspección visual el aspecto de las microemulsiones en términos de turbidez/transparencia y se determinaron los parámetros Z y PdI en cada muestra.

4.3.5 Caracterización química del aceite esencial de albahaca

Con el fin de determinar la composición química de la fase oleosa conteniendo activos terapéuticos se llevó a cabo la caracterización del AEA mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS, del inglés *gas chromatography-mass spectrometry*). Para esto, se utilizó un cromatógrafo de gases marca Agilent modelo 7890B (California, Estados Unidos), el cual estuvo equipado con una columna capilar de sílice fundida HP-5 (30 m x 0,25 mm d.i.; espesor de película 0,25 µm) y acoplado a un espectrómetro de masas Agilent modelo 5977A (California, Estados Unidos). Para el análisis, la temperatura del inyector se mantuvo a 290°C, utilizándose helio como gas portador a una velocidad de flujo de 1,0 mL min^{-1}. Inicialmente, se estableció un programa de temperatura del horno de 40–100°C con un gradiente de 3°C min^{-1}. Luego, se programó a 280°C a un gradiente de 10°C min^{-1}. Finalmente, la temperatura del horno se mantuvo a 280°C durante 5 min. La inyección de la muestra se realizó en modo split (1:20). El rango de masas fue de 40 a 500 unidades de masa atómica. La identificación de los compuestos del AEA se realizó contrastando los espectros de masas obtenidos con los espectros de masas contenidos en la librería del programa del equipo.

4.3.6 Carga de quercetina en la microemulsión y caracterización fisicoquímica

La obtención de la microemulsión cargada con quercetina (QE-ME) se llevó a cabo disolviendo 1,00 mg de QE en 0,50 mL de la fase oleosa (AEA), con agitación magnética constante a 25°C. Luego, a esta mezcla se añadió la combinación CR:ET (Smix) correspondiente y se tituló con agua ultrapura bajo agitación magnética moderada de tal manera de obtener una concentración final de QE de 100 mg L^{-1}. Entonces, QE-ME se almacenó en un recipiente de vidrio de color ámbar y a temperatura ambiente

(25°C). Posteriormente, se determinaron Z, PdI, pH, CE e IR tal como fue descrito anteriormente en las secciones 4.3.3.1 y 4.3.3.2 (pág. 132).

4.3.7 Estudio analítico de permeación

Tal como fue mencionado en la sección 1.3.2, Capítulo 1 (pág. 40), el método de difusión de Franz es ampliamente utilizado en la evaluación de la permeación transdérmica de principios activos. Para ello, se utiliza una celda en la cual el muestreo de alícuotas del medio de liberación se realiza manualmente. Esta metodología consume un elevado tiempo, induce errores operativos y la cuantificación de componentes es realizada generalmente *off-line* mediante técnicas cromatográficas. En nuestro caso, nos propusimos el diseño de una nueva celda de difusión miniaturizada, la cual denominamos *mini-Franz*, capaz de ser acoplada a un detector tradicional como ser un espectrofotómetro UV-Vis, sin la necesidad de modificaciones en el instrumento, y que permita el monitoreo en tiempo real, proporcionando la información necesaria para obtener resultados relacionados con la cinética de permeación de la formulación en estudio.

4.3.7.1 Celda de difusión mini-Franz

La celda *mini*-Franz propuesta constó de una cubeta de cuarzo convencional (compartimento aceptor) de 4,0 mL de volumen y un paso óptico de 1 cm a la que se incorporó en su parte superior un portamembrana/portamuestra de acrílico, el cual fue construído en el laboratorio con una fresadora con tecnología 3D (Creative maker®, Singapur) (Figura 4.3A). El portamembrana presentó un diámetro de 25 mm y fue diseñado para la incorporación de membranas de 23 mm de diámetro. Por otro lado, el portamuestra (compartimento donador) permitió la incorporación de un volumen de 200 µL de muestra. La agitación de la solución receptora en la en la celda se realizó mediante un sistema de agitación magnética diseñado en el laboratorio, el cual estuvo conformado por el *cooler* de un microprocesador (Ditron®; 12V) de 5 x 5 cm al que se le acopló en el eje de rotación una plancha metálica de 5 cm de longitud con un imán en cada uno de sus extremos (Figura 4.3B). Este sistema fue acoplado al espectrofotómetro, específicamente en un lateral de la celda y paralelamente a la misma. La activación del motor indujo la rotación de un pequeño imán recubierto en PTFE (3 mm) sumergido en el medio receptor contenido en la celda (Figura 4.3B).

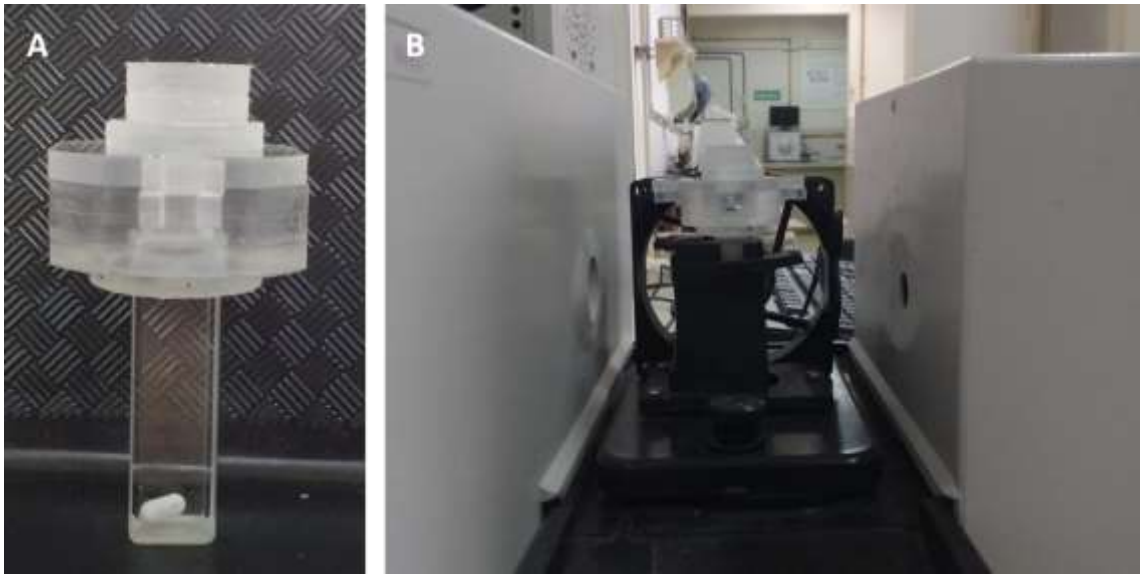


Figura 4.3. A) Celda de difusión miniaturizada mini-Franz construída en el laboratorio. B) Acoplamiento de la celda de difusión miniaturizada y el agitador magnético a un espectrofotómetro UV-Vis para el monitoreo del proceso de permeación en tiempo real.

4.3.7.2 Procedimiento de permeación

Para llevar a cabo el procedimiento de permeación utilizando la celda mini-Franz se colocaron en primer lugar 4 mL de una solución etanol:agua (1:1) como solución aceptora en la correspondiente celda conteniendo el imán y ubicada en el espectrofotómetro UV-Vis. Posteriormente se colocó una membrana de acetato de celulosa de 0,45 μm en el portamembrana y se cerró el sistema con el correspondiente portamuestra. Entonces se incorporó en este último 100 μL de muestra, activando simultáneamente la agitación. El proceso de permeación fue monitoreado registrando las señales de absorbancia a 276 nm durante 60 min.

Por otro lado, para validar la metodología propuesta se llevó a cabo el estudio de permeación utilizando una celda de Franz tradicional, siguiendo el procedimiento detallado en la sección 2.3.6.2, Capítulo 2 (pág. 66) y utilizando la misma membrana sintética (acetato de celulosa, tamaño de poro: 0,45 μm). Es importante destacar que ambos procedimientos, es decir mini-Franz y Franz tradicional, se llevaron a cabo a temperatura ambiente (25°C).

4.3.8 Ensayos antivirales *in-vitro*

Los ensayos antivirales *in-vitro* son fundamentales ya que permiten estudiar el comportamiento de nuevas formulaciones en un entorno controlado y aislado. Estos ensayos incluyen métodos para evaluar la eficacia en etapas previas al análisis clínico, logrando medir la actividad antiviral de una formulación, simulando las condiciones de infección celular y evaluando su capacidad para inhibir la replicación viral o reducir el título viral, entre otros parámetros. Además, constituyen una herramienta esencial para la optimización de dosis y formulaciones antes de su aplicación en estudios preclínicos en animales o humanos. Es importante distinguir que el título viral se refiere a la cantidad de virus presente en una muestra[240] mientras que la dosis infectiva corresponde a la cantidad mínima de virus necesaria para causar infección en un organismo o sistema biológico[241]. En los estudios de dosis-respuesta destinados a determinar la dosis infectiva de un agente patógeno, resulta particularmente útil identificar la cantidad mínima capaz de producir infección en el 50% de la población susceptible (DI_{50}). Para ello, es primordial definir la multiplicidad de infección (MOI, del inglés *multiplicity of infection***)**, que se refiere a la relación entre el número de partículas virales y las células objetivo en un ensayo de infección. Esto se utiliza para estandarizar las condiciones de infección, permitiendo una comparación precisa de los efectos antivirales a distintas concentraciones de virus. El método de Reed y Muench[242] propuesto desde 1938 se sigue utilizando en la actualidad como la técnica estadística de elección en campos de la microbiología para evaluar la virulencia de patógenos y eficacia de tratamientos. Este método emplea una función estadística que relaciona una dosis con la probabilidad de un evento (la infección). Esta relación se expresa a través de la ecuación 4.1:

$$P = \frac{\Phi\,(D-\mu)}{\sigma} \qquad \text{Ecuación 4.1}$$

donde Φ es la función de distribución normal acumulada, D es la dosis, μ es la media y σ es la correspondiente desviación estándar. Así, por interpolación, es posible obtener la DI_{50}, la cual es la dosis que corresponde a una tasa de infección del 50% a partir de los resultados experimentales.

[240] Karakus, U., Crameri, M., Lanz, C., & Yángüez, E. (2018). Propagation and titration of influenza viruses. *Influenza Virus: Methods and Protocols*, 59-88.
[241] Fenner, F., Bachmann, P. A., Gibbs, E. P. J., Murphy, F. A., Studdert, M. J., & White, D. O. (2014). Cultivation and assay of viruses. *Veterinary virology*, 39.
[242] Reed, L. J., & Muench, H. (1938). A simple method of estimating fifty per cent endpoints.

Por otro lado, en estudios *in-vitro*, el uso de monocapas celulares permite evaluar de forma controlada la respuesta de las células frente a distintos agentes químicos o biológicos. Las estrategias experimentales suelen incluir:

Ensayos de pre-tratamiento. Las células se exponen previamente a una sustancia antes de la exposición con el agente patógeno, con el objetivo de analizar posibles efectos protectores o moduladores.

Ensayos de adsorción (binding). Se utilizan para investigar la capacidad de una sustancia o partícula para unirse a la superficie celular o a componentes específicos (como receptores virales). Estos estudios son fundamentales para comprender los mecanismos de acción, la interacción inicial entre el agente activo y la célula, y su influencia sobre la infectividad, la señalización celular o la internalización de compuestos.

Además, determinar la viabilidad celular es fundamental para evaluar los efectos citotóxicos de diferentes compuestos, formulaciones o condiciones experimentales sobre cultivos celulares. Esta información es crucial en estudios preclínicos, ya que permite identificar concentraciones seguras y eficaces de sustancias bioactivas, como fármacos, extractos naturales o sistemas de liberación como lo son las microemulsiones[243]. Para evaluar la viabilidad celular, el ensayo de MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolio) es uno de los estudios de citotoxicidad más ampliamente utilizado[244]. Este ensayo se basa en la capacidad de la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa, presente en células viables, de reducir el MTT a cristales de formazán, un compuesto insoluble de color azul. La cantidad de formazán formado es directamente proporcional a la actividad metabólica celular y, por tanto, a la viabilidad de las células. Posteriormente, el formazán se solubiliza en un disolvente adecuado y se cuantifica espectrofotométricamente a una longitud de onda de 570 nm. Los resultados se expresan comúnmente como porcentaje de viabilidad celular en relación con un control.

4.3.8.1 Ensayos con betacoronavirus bovino

Se evaluó el comportamiento de microemulsiones frente a la cepa Mebus de betacoronavirus bovino (BCoV) cultivada en el Laboratorio de Virología, Facultad de

[243] Theochari, I., Papadimitriou, V., Papahatjis, D., Assimomytis, N., Pappou, E., Pratsinis, H., ... & Pletsa, V. (2018). Oil-in-water microemulsions as hosts for benzothiophene-based cytotoxic compounds: An effective combination. *Biomimetics*, *3*(2), 13.
[244] Tolosa, L., Donato, M. T., & Gómez-Lechón, M. J. (2015). General cytotoxicity assessment by means of the MTT assay. *Protocols in in vitro hepatocyte research*, 333-348.

Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires (UNCPBA), Tandil, Argentina. En este caso, en primer lugar se determinó el título viral, y posteriormente se realizaron ensayos de citotoxicidad, pre-tratamiento y el ensayo de adsorción viral (*binding)*.

Título viral. Los títulos virales de BcoV fueron determinados mediante titulación en microplaca utilizando el método de Reed y Muench. Tal como se comentó, este método permite calcular la dilución del punto final o la dosis infectiva del 50% en cultivo celular ($DICC_{50}$), basada en la observación del efecto citopático (ECP) expresándose como $DICC_{50}\ mL^{-1}$. Para la preparación del stock viral, la cepa Mebus de BcoV fue propagada en células HRT-18 (del inglés, *human rectum adenocarcinoma*) cultivadas en placas de 96 pocillos, utilizando como medio de mantenimiento DMEM/F12. La infección se realizó con una MOI de 1 y las células fueron incubadas durante 72 h. Los sobrenadantes fueron recolectados tanto de los pocillos infectados, al momento de aparición del ECP, como de los grupos control. Los aislamientos virales positivos, es decir, aquellos que presentaron ECP, fueron posteriormente titulados mediante microtitulación en placa.

Ensayo de citotoxicidad. Para este estudio se utilizaron células HRT-18, sustrato susceptible a la replicación del coronavirus bovino (BCoV). La viabilidad celular se evaluó mediante un ensayo de reducción de MTT, que estima la actividad metabólica de las células. Las monocapas celulares fueron expuestas durante 24 h a 37°C a 15 µL de microemulsión, tanto sin diluir como diluidas 1:10 en medio de cultivo. Finalizado el periodo de incubación, se añadieron 20 µL de una solución de MTT (5 $mg\ mL^{-1}$) a cada pocillo, incubando nuevamente a 37°C durante 4 h. Posteriormente, se eliminaron los sobrenadantes y los cristales de formazán formados fueron solubilizados con 200 µL de DMSO. La absorbancia se midió a 570 nm utilizando un lector de microplacas Biotek (Vermont, Estados Unidos). Los ensayos se realizaron por triplicado. Como control negativo se incluyeron pocillos con células no expuestas a las microemulsiones, con el fin de establecer una referencia basal de viabilidad celular.

Pre-tratamiento de monocapas celulares. Para evaluar el efecto protector de las microemulsiones sobre la infección viral, células HRT-18 cultivadas en placas de 96 pocillos fueron expuestas a 15 µL de microemulsiones durante 1 h a 37°C. Finalizada la incubación, las monocapas fueron lavadas cuidadosamente con PBS para eliminar el exceso de microemulsión. A continuación, se procedió a la inoculación con BCoV a una MOI de 1, permitiendo la adsorción viral durante 45 min a 37°C. Luego se realizaron nuevos lavados con PBS para remover el virus no adsorbido, y se añadió medio fresco

DMEM/F12 suplementado con tripsina al 0,05%. El ensayo se llevó a cabo por triplicado para cada condición experimental. Los sobrenadantes fueron recolectados a las 24 h y 48 h post-infección y almacenados a -80°C hasta su posterior titulación viral.

Ensayo de adsorción viral (binding). Mediante este ensayo se evaluó la capacidad de las microemulsiones para adsorber los viriones de BCoV. Para ello, se añadieron 210 µL de formulación en tubos de microcentrífuga estériles. Posteriormente se adicionaron 40 µL de una suspensión viral de BCoV a cada tubo, obteniéndose un volumen final de 250 µL por reacción. Las mezclas se incubaron a 25°C bajo agitación constante durante 30 min para favorecer la interacción entre las partículas virales y los componentes de la microemulsión. Finalizado el tiempo de incubación, los tubos se centrifugaron a 16.000g durante 5 min. Este paso permitió la sedimentación de las microemulsiones junto con las partículas virales adsorbidas, dejando el virus no-adsorbido en el sobrenadante. Posteriormente, se colectó cuidadosamente el sobrenadante el cual fue empleado para el aislamiento viral y determinación del título infectivo mediante ensayo en células HRT-18.

4.3.8.2 Ensayos con alfaherpesvirus bovino 1

Se evaluó el comportamiento de microemulsiones frente a la cepa Cooper de alfaherpesvirus bovino 1 (BoHV-1), cultivada en el Laboratorio de Virología, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires (UNCPBA), Tandil, Argentina. En este caso se determinó el título viral, se realizaron ensayos de citotoxicidad, pre-tratamiento de células y el ensayo de adsorción viral (*binding*).

Título viral. Para este ensayo, los títulos virales fueron determinados mediante titulación en microplaca utilizando el método de Reed y Muench, el cual como hemos mencionado permite calcular la $DICC_{50}$. El stock viral de BoHV-1 cepa Cooper se preparó cultivando el virus en la línea celular MDBK (del inglés, *Madin Darby bovine kidney*) en placas de 96 pocillos utilizando como medio de cultivo MEM suplementado con suero fetal bovino (FBS, del inglés *fetal bovine serum*). Para la propagación viral, se utilizó una MOI de 1 permitiendo obtener títulos adecuados para los ensayos posteriores.

Ensayo de citotoxicidad. En este estudio se emplearon células MDBK utilizadas como sustrato para la replicación de BoHV-1. Se realizó la prueba de MTT para evaluar la viabilidad celular de las monocapas celulares expuestas durante 24 h a 15 µL de

microemulsiones, tanto sin diluir como diluidas 1:10 en medio de cultivo. Los ensayos se realizaron por triplicado y como control negativo se incluyeron pocillos con células sin exposición a las microemulsiones para establecer una referencia basal de viabilidad celular.

Pre-tratamiento de monocapas celulares. Con el fin de estudiar el efecto protector de las microemulsiones sobre la infección por BoHV-1, se siguió un protocolo análogo al descrito para BCoV. Para este ensayo, las monocapas celulares de MDBK sembradas en placas de 96 pocillos se incubaron con 15 µL de cada muestra durante 1 h a 37°C. Luego de esta exposición, las células se lavaron con PBS para eliminar el exceso de formulación y se inoculó BoHV-1 a una MOI de 1, permitiendo la adsorción viral durante 45 min a 37°C. Transcurrido el tiempo de adsorción, se realizaron nuevos lavados con PBS para retirar el virus no adsorbido, y se añadió MEM suplementado con 10% de FBS. El MEM provee los nutrientes básicos para las células, mientras que el FBS aporta factores de crecimiento y proteínas que favorecen la viabilidad celular y la replicación del virus durante el experimento. Cada ensayo se realizó por triplicado. Los sobrenadantes se recogieron a las 24 h post-infección y se almacenaron a -80 °C hasta la posterior determinación del título viral.

Ensayo de adsorción viral (binding). El estudio de adsorción viral se replicó utilizando BoHV-1 bajo las mismas condiciones experimentales previamente descritas para BCoV. En este caso, el ensayo se utilizó para evaluar la capacidad de las microemulsiones de adsorber los viriones de BoHV-1. Para ello, se emplearon 210 µL de muestra y se adicionaron 40 µL de una suspensión viral de BoHV-1. La incubación, agitación, centrifugación y recolección del sobrenadante se realizaron de forma análoga a la sección 4.3.8.1, pág 137. El sobrenadante recuperado, que contenía la fracción de virus no adsorbido fue utilizado para la titulación del virus en células MDBK.

4.3.9 Ensayo de capacidad antioxidante

El ensayo de capacidad antioxidante mediante el método del radical libre 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH) es ampliamente utilizado para evaluar la actividad captadora de radicales libres de compuestos naturales[245]. Este método se basa en la

[245] Saint Martin, E. M., Sosa, A. M., Martinez, C. S., Prieto, J., Marrassini, C., Dobrecky, C. B., ... & Anesini, C. (2024). In Vitro Antioxidant Activity and Anticonvulsant Properties on Zebrafish PTZ-Induced Seizure Model of a Tilia viridis Aqueous Extract. *Journal of Pharmacopuncture*, *27*(3), 211.

reducción del radical DPPH, un compuesto orgánico nitrogenado que presenta un color púrpura intenso en solución. En el ensayo, el radical cromógeno de color púrpura es reducido por la presencia de compuestos antioxidantes/reductores a la correspondiente hidrazina de color amarillo pálido. La capacidad reductora de los antioxidantes hacia el DPPH se evalúa mediante el monitoreo de la disminución de la absorbancia a 517 nm.

Para determinar la capacidad antioxidante de las muestras de microemulsiones, se preparó una solución metanólica de DPPH de concentración 100 μmol L^{-1}. Para ello, se disolvieron 4,0 mg del reactivo en 100,0 mL de metanol. La solución se homogeneizó con movimientos de inversión y se almacenó en frasco color ámbar al abrigo de la luz para protegerlo de la oxidación. Por otro lado, las formulaciones se analizaron en un rango de concentraciones de 0,016 a 40 g L^{-1}. Para ello, se prepararon dos soluciones madre en concentraciones de 16 g L^{-1} y 160 g L^{-1} para cada formulación y las alícuotas correspondientes se diluyeron con metanol para obtener 1,00 mL de muestra. Este volumen se mezcló con 3,00 mL de solución metanólica de DPPH (100 μmol L^{-1}). Además, se emplearon 10 μg mL^{-1} de solución metanólica de ácido ascórbico (AA) como control positivo[246]. Para ello, se disolvieron 2,00 mg de AA en 5,00 mL de metanol (400 μg mL^{-1}). De esta solución se tomó una alícuota de 0,100 mL y se llevó a 1,00 mL con metanol. Finalmente, este volumen se mezcló con 3,00 mL de DPPH. Tanto las muestras como el control se almacenaron al abrigo de la luz y luego de 30 min de incubación se registraron las señales de absorbancia a 517 nm utilizando un espectrofotómetro Shimadzu modelo i1900 (Tokio, Japón). Entonces, se calculó el porcentaje de DPPH depurado (% $DPPH_{dep}$) según la Ecuación 4.2:

$$\% DPPH_{dep} = \frac{(Ai - Am)}{Ai} \times 100 \qquad \text{Ecuación 4.2}$$

donde Ai es la absorbancia de la solución de DPPH a 517 nm al inicio del ensayo, y Am es la absorbancia de la solución de DPPH tratada con la correspondiente alícuota de la muestra después de 30 min y a la misma longitud de onda.

[246] Conesa, A. L., Dellatorre, F. G., Latour, E., Ponce, N. M. A., Stortz, C. A., Scolaro, L. A., ... & Ayala-Peña, V. B. (2024). Antiviral potential of extracts from Myriogloea major against herpes simplex type 1, 2 and bovine coronavirus. *Phycological Research*, *72*(4), 249-257.

4.4 Resultados y discusión

4.4.1 Comportamiento de fases

La Figura 4.4A y 4.4B exhibe los dos diagramas de fases pseudoternarios obtenidos, cada uno correspondiente a la relación de peso CR:ET estudiada, es decir, 1:1 y 2:1, respectivamente. En ambos diagramas la zona azul representa sistemas monofásicos los cuales se mostraron transparentes. Es importante destacar que el área representada fue mayor en el caso de una relación CR:ET de 2:1, lo que demuestra que existe una mayor posibilidad de combinaciones de componentes que llevan a la probable formación de microemulsiones. Por otro lado, gran parte de los sistemas correspondientes a una relación 1:1 de surfactante:co-surfactante no resultaron estables en el tiempo, observándose turbidez a lo largo de las horas. Por lo tanto, se seleccionó la región correspondiente a una relación 2:1 de CR:ET como zona probable de formación de microemulsiones ya que, además de transparencia, los sistemas no mostraron signos de inestabilidad, como turbidez o separación de fases, después de 24 h de su obtención. Por lo tanto, los sistemas obtenidos con esta relación surfactante:co-surfactante fueron seleccionados para estudios posteriores.

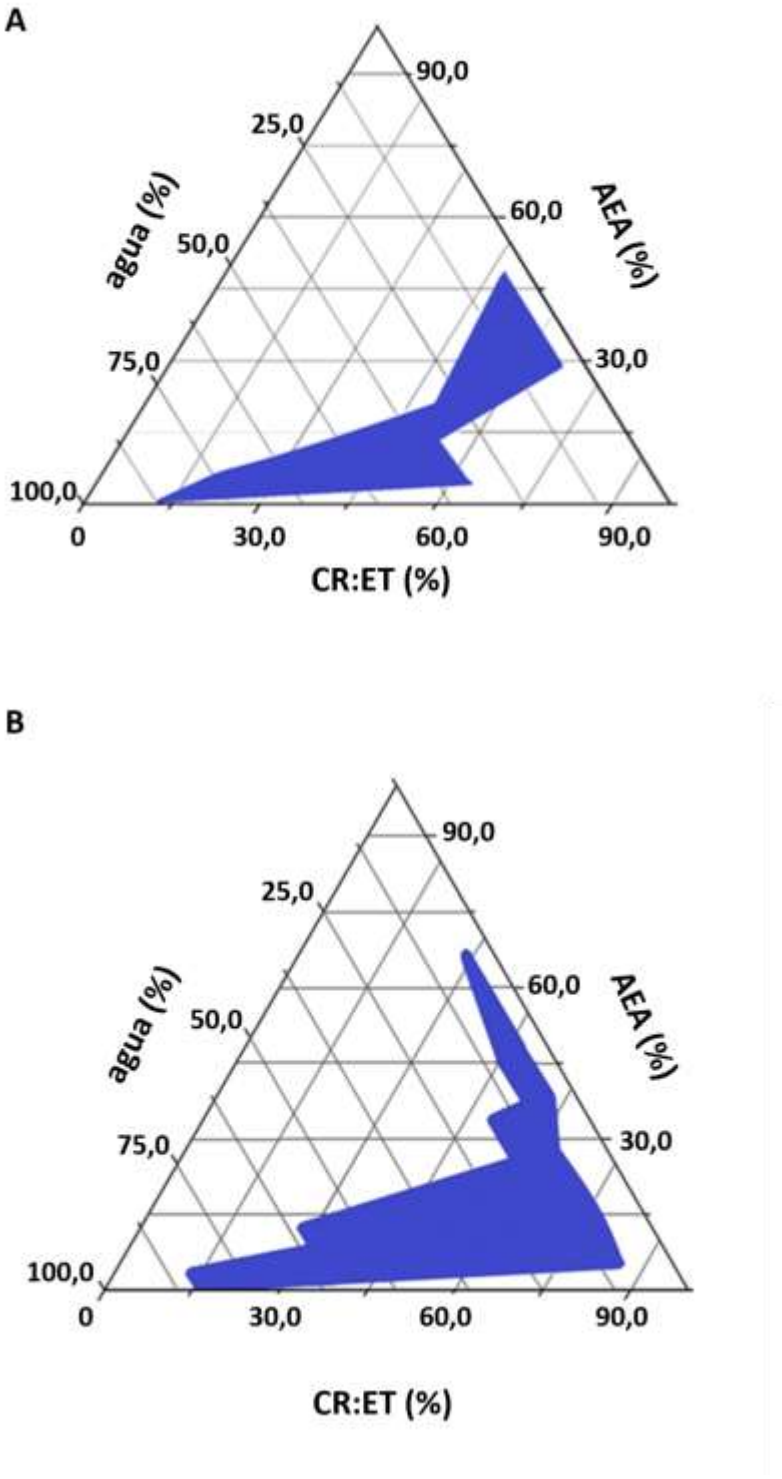


Figura 4.4. Diagramas de fases pseudoternarios construidos con diferentes relaciones de fase oleosa (AEA), fase acuosa y Smix (CR:ET). A) Smix con una relación surfactante:co-surfactante 1:1. B) Smix con una relación surfactante:co-surfactante 2:1.

4.4.2 Caracterización fisicoquímica de las microemulsiones

Como puede verse en la Tabla 4.2 se seleccionaron cinco posibles microemulsiones con diferentes proporciones de componentes correspondientes a la relación surfactante:co-surfactante seleccionada (2:1).

Tabla 4.2. Composición de las microemulsiones seleccionadas (ME1 a ME5) correspondientes a una relación 2:1 de CR:ET.

ME	AEA*	CR:ET*	Agua*
ME1	2,50	37,7	59,8
ME2	3,00	25,0	72,0
ME3	5,00	30,0	65,0
ME4	7,50	27,0	66,0
ME5	10,0	40,0	50,0

* Las concentraciones están expresadas en % (p/p)

La Tabla 4.3 muestra los parámetros fisicoquímicos Z, PdI, pH, IR y CE correspondientes a las microemulsiones seleccionadas. Las mismas exhibieron valores de Z en el rango de 14,74-21,05 nm observándose que el incremento en las concentraciones de surfactante y/o fase oleosa generó un incremento en el tamaño de gota. Concentraciones más elevadas de fase oleosa involucran, en general, un aumento en la concentración de la mezcla surfactante-co-surfactante para obtener sistemas estables. Como se mencionó antes, si bien un aumento en la concentración de surfactante podría conducir a tamaños de gota menores, un aumento excesivo de surfactante podría generar una menor velocidad de difusión, aumentando el tamaño de gota. Si bien en el caso de las microemulsiones obtenidas hay un aumento de tamaño de gota conforme el porcentaje de fase oleosa aumenta, los valores obtenidos son levemente mayores y, en todos los casos, los sistemas fueron monodispersos, obteniéndose valores de PdI muy bajos, menores a 0,10. Por otro lado, el pH es una variable de gran importancia en el desarrollo de formulaciones farmacéuticas, ya que está relacionado con su estabilidad, eficacia, solubilidad y biodisponibilidad. En todas las muestras los valores de pH estuvieron comprendidos en un rango apropiado para una potencial aplicación tópica. En cuanto al IR, los valores confirmaron la presencia de sistemas isotrópicos y los valores de CE demostraron, como era de esperar, que las microemulsiones son de tipo (o/w). En este sentido, si observamos la estructura química del surfactante utilizado en este caso (Figura

4.2), el componente principal del Cremophor EL es el glicerol polietilenglicol ricinoleato. Éste, en conjunto con los ésteres de ácidos grasos de polietilenglicol, conforma la parte hidrofóbica de la molécula, estando la porción hidrofílica conformada por polietilenglicoles libres y glicerol etoxilado. El valor de HLB para Cremophor EL está en el rango de 12-14, lo que lo hace adecuado para la obtención de sistemas (o/w). Por otro lado, el aceite esencial de albahaca es insoluble o muy poco soluble en agua, lo que hace que interactúe con la porción hidrofóbica del surfactante.

Tabla 4.3. Caracterización fisicoquímica de las microemulsiones seleccionadas (ME1 a ME5) con una relación surfactante:co-surfactante (CR:ET) de 2:1. Las determinaciones fueron realizadas por triplicado (n=3) y cada valor está acompañado de su correspondiente desviación estándar.

	Z (nm)	PdI	pH	IR	C (mS cm^{-1})
ME1	14,74 ± 0,13	0,050 ± 0,001	3,99 ± 0,01	1,3827 ± 0,0102	0,101 ± 0,001
ME2	17,81± 0,38	0,024 ± 0,021	4,08 ± 0,02	1,3843 ± 0,0101	0,102 ± 0,001
ME3	15,69 ± 0,04	0,030 ± 0,006	4,19 ± 0,01	1,3865± 0,0107	0,101 ± 0,001
ME4	20,11 ± 0,08	0,043 ± 0,004	4,57 ± 0,03	1,3828± 0,0106	0,102 ± 0,001
ME5	21,05 ± 0,13	0,062 ± 0,019	4,53 ± 0,01	1,3837± 0,0103	0,103 ± 0,002

C: conductividad; IR: índice de refracción; PdI: índice de polidispersidad; Z: tamaño de gota

4.4.3 Estudio de estabilidad

Los resultados correspondientes al estudio de estabilidad incluyendo los valores de Z y PdI obtenidos al finalizar cada etapa de los ciclos de enfriamiento-calentamiento al que fueron sometidas las microemulsiones se presentan en la Tabla 4.4. Como se puede observar, no hubo diferencias estadísticamente significativas en el tamaño de las gotas y los sistemas se mantuvieron monodispersos a lo largo de los cuatro días de estudio. La Figura 4.5 muestra los gráficos de distribución de tamaño obtenidos para cada microemulsión, los cuales demuestran claramente que los sistemas se mantuvieron estables a lo largo de los días y frente a los cambios de temperatura analizados.

Tabla 4.4. Resultados del estudio de estabilidad de las muestras ME1 a ME5. Los valores de Z y PdI fueron obtenidos por DLS durante los días que se llevaron a cabo los ciclos de enfriamiento-calentamiento. Las medidas fueron realizadas por triplicado (n=3) y cada valor está acompañado con su correspondiente desviación estándar.

	Día 1 (40 °C)	Día 2 (4 °C)	Día 3 (40 °C)	Día 4 (4 °C)
	Z (nm) **PdI**	**Z (nm)** **PdI**	**Z (nm)** **PdI**	**Z (nm)** **PdI**
ME1	15,70 ± 0,07 0,040 ± 0,003	15,71 ± 0,01 0,040 ± 0,003	15,81 ± 0,03 0,020 ± 0,012	15,77 ± 0,01 0,020 ± 0,003
ME2	20,02 ± 0,18 0,050 ± 0,005	19,48 ± 0,04 0,040 ± 0,010	19,68 ± 0,02 0,030 ± 0,006	19,67 ± 0,04 0,050 ± 0,002
ME3	17,38 ± 0,20 0,030 ± 0,012	16,97 ± 0,02 0,040 ± 0,005	17,18 ± 0,06 0,020 ± 0,006	17,21 ± 0,06 0,040 ± 0,016
ME4	14,23 ± 0,11 0,050 ± 0,010	14,20 ± 0,08 0,020 ± 0,002	14,25 ± 0,08 0,020 ± 0,002	14,13 ± 0,00 0,040 ± 0,006
ME5	20,07 ± 0,12 0,030 ± 0,003	20,17 ± 0,10 0,040 ± 0,005	20,00 ± 0,11 0,040 ± 0,001	19,92 ± 0,07 0,030 ± 0,011

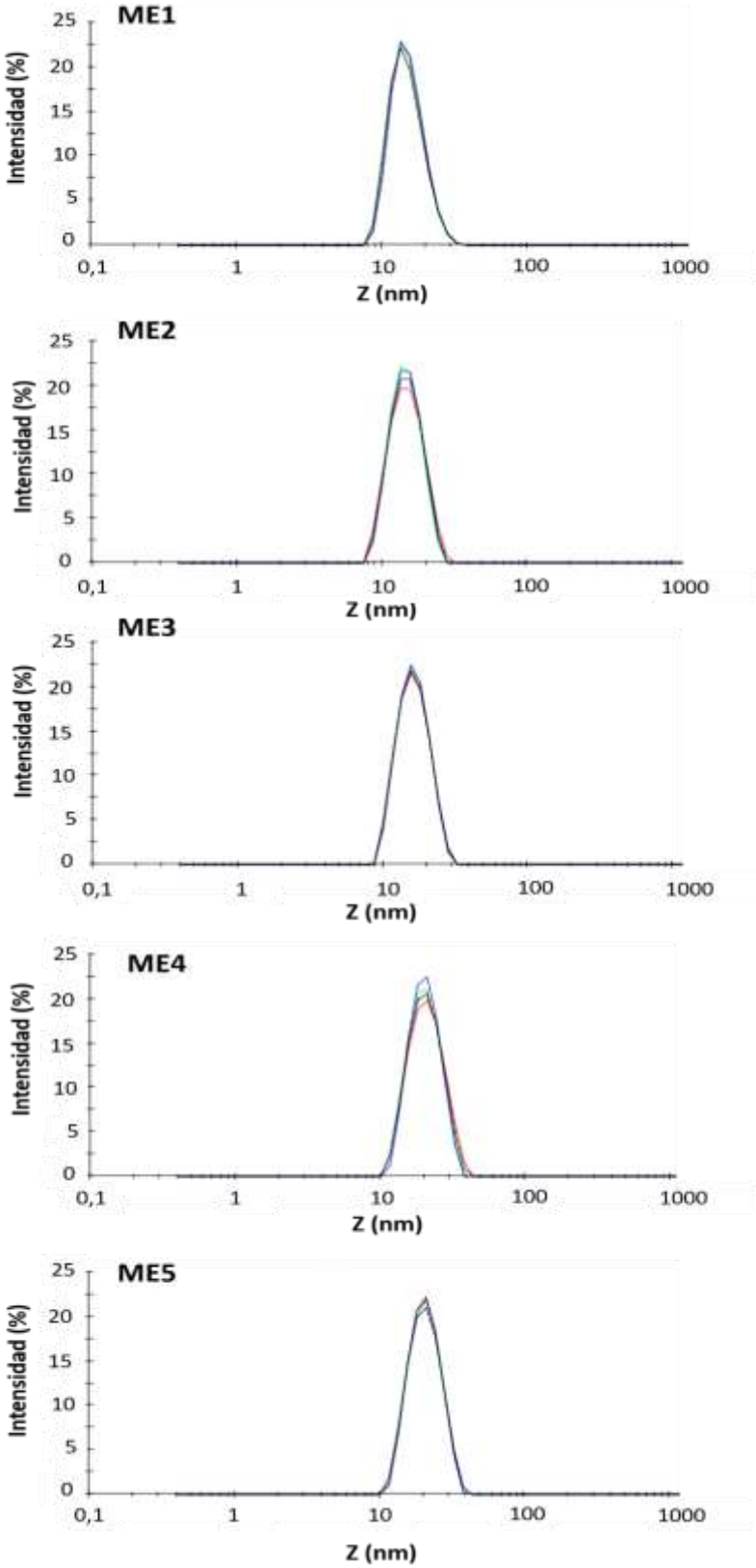


Figura 4.5. Gráficos de distribución de tamaño obtenidos por DLS y correspondientes a las muestras de microemulsiones ME1 a ME5 las cuales fueron sometidas a ciclos de frío-calor (4-40°C) durante 4 días consecutivos. Las determinaciones fueron realizadas por triplicado (n= 3).

4.4.4 Caracterización química del aceite esencial de albahaca

Los aceites esenciales han sido ampliamente estudiados por sus propiedades biológicas, incluyendo actividad antimicrobiana, antioxidante y antiviral[247]. Se ha reportado que los aceites esenciales pueden interferir con la replicación viral, la integridad de la envoltura lipídica y la interacción del virus con las células huésped, lo que los convierte en candidatos promisorios para el desarrollo de terapias naturales contra infecciones virales. Como se mencionó previamente, el AEA es una mezcla compleja de compuestos orgánicos volátiles, como terpenos, alcoholes, aldehídos, éteres y cetonas, entre otros. La actividad antiviral del AEA podría atribuirse a la presencia de algunos de estos compuestos y a su probable acción sinérgica. En la Tabla 4.5, se muestran los resultados del estudio cromatográfico de caracterización realizado al AEA utilizado como fase oleosa en la síntesis de las microemulsiones propuestas. Como puede observarse, se separaron e identificaron químicamente 15 compuestos, los cuales representaron el 100,00% del total. El principal componente del AEA analizado fue el estragol (1-alil-4-metoxibenceno), con una abundancia del 95,3% (Figura 4.6). Este compuesto es un fenilpropanoide, específicamente un éter metílico del anetol, caracterizado por la presencia de un anillo bencénico sustituido con un grupo metoxi (-OCH3) y una cadena alílica (-CH2-CH=CH2). Se ha demostrado que el estragol posee propiedades antivirales contra el virus del herpes simple y del virus de la parainfluenza tipo 3[248]. El segundo compuesto obtenido en proporción mayoritaria fue el linalool (2,87%), un monoterpeno lineal oxigenado que contiene un grupo alcohol (-OH) en su estructura. Su conformación molecular le permite interactuar con membranas lipídicas, lo que podría contribuir a su actividad biológica. Se ha informado que en los aceites esenciales de Salvia sclarea, mejorana y anís, el linalool es uno de los compuestos más abundantes y que estos aceites exhiben actividad antiviral contra el virus influenza[249]. El tercer compuesto mayoritario identificado fue el 1,8-cineol (0,58%), también conocido como eucaliptol. Se trata de un

[247] Ma, L., & Yao, L. (2020). Antiviral effects of plant-derived essential oils and their components: an updated review. *Molecules, 25*(11), 2627.
[248] Mahendra, M. Y., Purba, R. A., Dadi, T. B., & Pertiwi, H. (2023). Estragole: a review of its pharmacology, effect on animal health and performance, toxicology, and market regulatory issues.
[249] Abou Baker, D. H., Amarowicz, R., Kandeil, A., Ali, M. A., & Ibrahim, E. A. (2021). Antiviral activity of Lavandula angustifolia L. and Salvia officinalis L. essential oils against avian influenza H5N1 virus. *Journal of Agriculture and Food Research*, *4*, 100135.

monoterpeno cíclico oxigenado, estructuralmente un éter epoxídico con un puente de oxígeno entre los carbonos 1 y 8 del esqueleto de p-mentano. Esta configuración le confiere propiedades lipofílicas, facilitando su interacción con las membranas virales. Su actividad antiviral ha sido ampliamente documentada, con efectos inhibitorios contra virus de la influenza, virus del herpes simple y coronavirus tipo 2 (SARS-CoV-2)[250], entre otros. De esta manera, es muy probable que los componentes presentes en el AEA utilizado presenten cierta actividad antiviral frente a los virus propuestos en este trabajo (BCoV y BoHV-1).

Tabla 4.5. Resultados del análisis por CG-MS del AEA utilizado en la síntesis de las microemulsiones propuestas. Las filas coloreadas corresponden a los principales componentes activos encontrados (1,8-cineol, linalool y estragol).

Compuesto	tr (min)	PM (g/mol)	FQ	Porcentaje (%)
α-pineno	10,59	136,12	$C_{10}H_{16}$	0,03
β-pineno	12,46	136,12	$C_{10}H_{16}$	0,05
1,8-Cineol	15,00	154,14	$C_{10}H_{18}O$	0,59
cis-óxidolinalool	17,45	170,13	$C_{10}H_{18}O_2$	0,04
Linalool	18,38	154,14	$C_{10}H_{18}O$	2,87
L-mentol	21,77	156,15	$C_{10}H_{20}O$	0,07
Ursodiol	21,91	392,29	$C_{24}H_{10}O_4$	0,04
Carveol	22,05	152,12	$C_{10}H_{16}O$	0,10
α-terpineol	22,44	154,14	$C_{10}H_{18}O$	0,17
Estragol	22,77	148,09	$C_{10}H_{12}O$	95,3
Bornil acetato	25,07	196,15	$C_{24}H_{20}O_2$	0,06
Aromadendreno	26,89	204,19	$C_{15}H_{24}$	0,02
α-bergamoteno	27,87	204,19	$C_{15}H_{24}$	0,37

[250] Ćavar Zeljković, S., Schadich, E., Džubák, P., Hajdúch, M., & Tarkowski, P. (2022). Antiviral activity of selected Lamiaceae essential oils and their monoterpenes against SARS-CoV-2. *Frontiers in Pharmacology, 13*, 893634.

β-cariofileno	28,64	204,19	$C_{15}H_{24}$	0,02
T-cadinol	30,77	222,19	$C_{15}H_{26}O$	0,27
Total				**100,00**

tr: tiempo de retención; PM: peso molecular; FQ: fórmula química

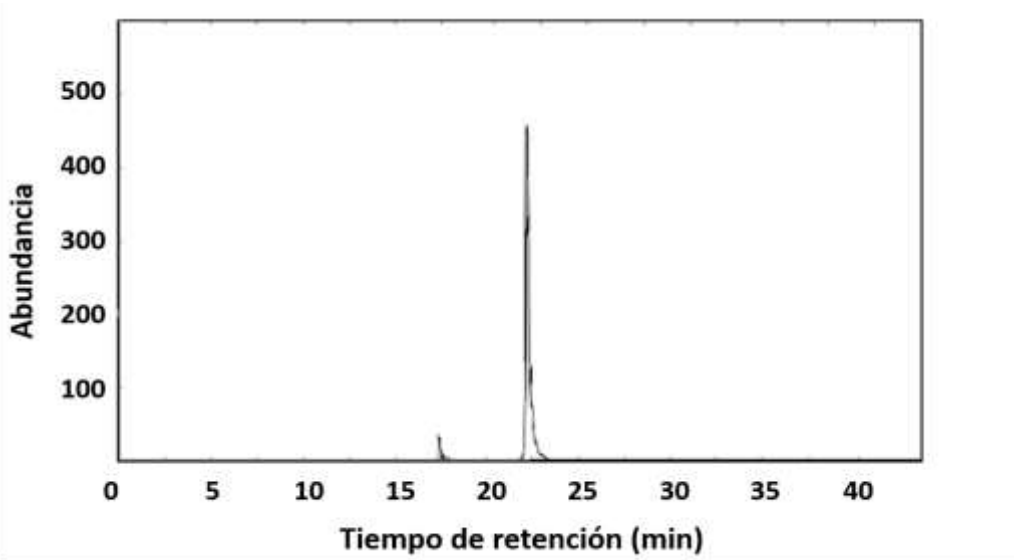


Figura 4.6. Cromatograma del AEA utilizado en la síntesis de las microemulsiones propuestas obtenido por CG-MS. El pico que se destaca corresponde al compuesto mayoritario encontrado, estragol (95,3%), el cual presentó un tiempo de retención de 22,77 min.

4.4.5 Carga de quercetina y caracterización fisicoquímica

En base a los resultados obtenidos en los estudios de caracterización fisicoquímica y estabilidad, M1 a M5 serían sistemas portadores apropiados para QE. Sin embargo, ME3 contiene una concentración de 5,0% de AEA, la cual puede resultar bioactiva sin comprometer la estabilidad de la formulación o aumentar el riesgo de irritación de la piel del animal. A esto último, una concentración intermedia de Smix (30%) resultaría adecuada, dado que altas concentraciones de surfactante y co-surfactante podrían generar efectos no deseados en la zona de aplicación de la formulación. Por otro lado, ME3 presentó un pH de 4,19 algo superior a las microemulsiones con menor concentración de AEA, como ME1 y ME2. De esta manera, si bien ME3 contiene mayor concentración de AEA que ME1 y ME2, su pH más bajo puede atenuar los posibles efectos irritantes que pueden causar altas concentraciones de aceite esencial. Por ello, se seleccionó a ME3 como un sistema portador adecuado para QE, la cual se incorporó en una concentración

final de 100 mg L^{-1}. La Figura 4.7A muestra la microemulsión ME3 cargada exitosamente con QE (QE-ME), la cual se formó espontáneamente y se mostró como un sistema transparente y termodinámicamente estable.

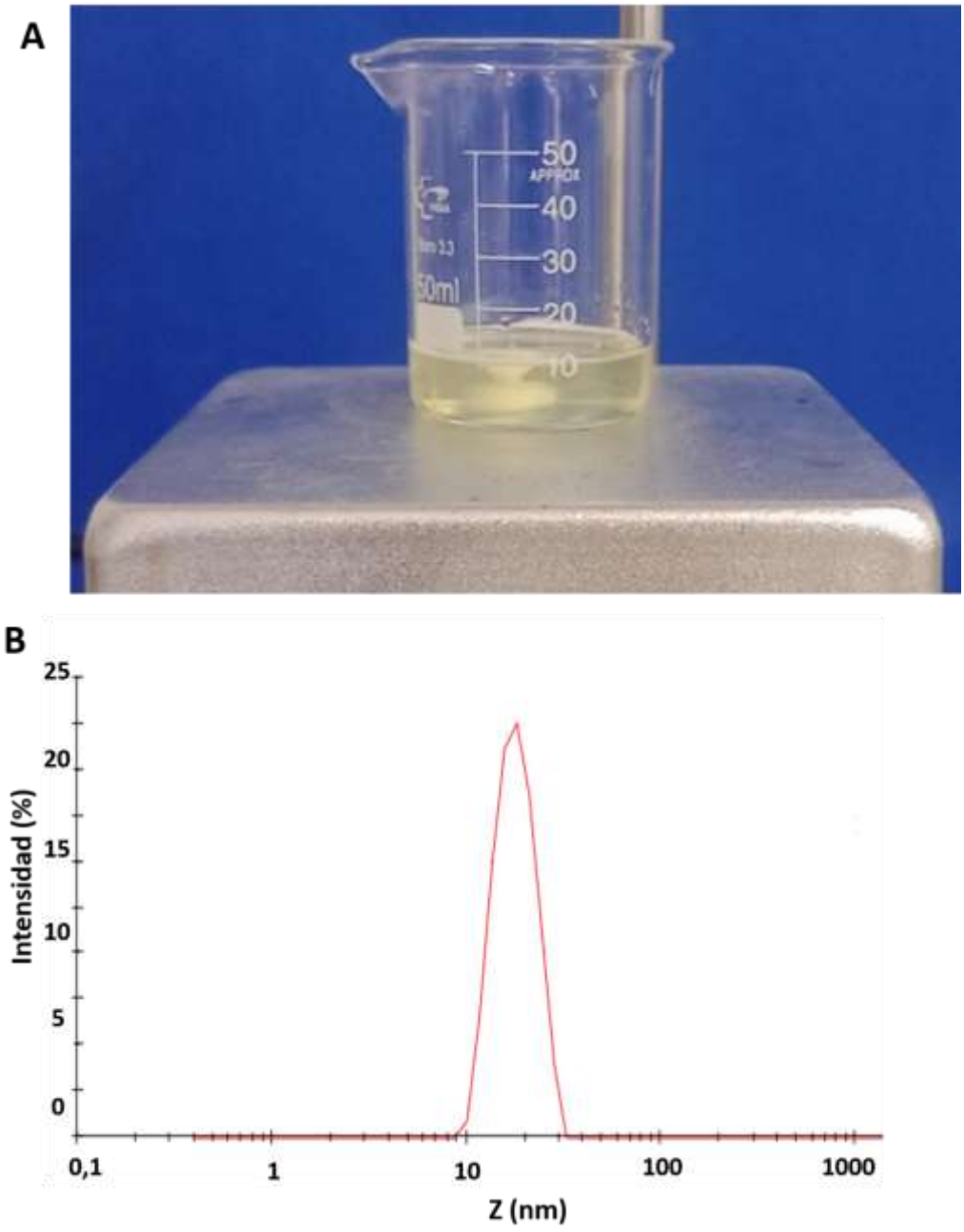


Figura 4.7. A) Formulación QE-ME conformada por AEA (5,0%), Smix (30,0%) y agua (65,0%) y cargada con el flavonoide QE en una concentración de 100 mg L^{-1}. La misma puede apreciarse transparente y además resultó estable. B) Gráfica de distribución del tamaño de gota de QE-ME obtenida por DLS en la cual puede presumirse la presencia de un sistema monodisperso. Las determinaciones fueron realizadas por triplicado (n= 3).

En cuanto a los estudios de caracterización fisicoquímica realizados sobre QE-ME, ésta resultó ser un sistema monodisperso con un PdI de (0,049 ± 0,027) y un tamaño de gota de (17,47 ± 0,33) nm, un valor levemente mayor a la microemulsión sin cargar (ME3), cuyo tamaño de gota fue (15,69 ± 0,04) nm, lo cual resulta esperable. En la Figura 4.7B se muestra la distribución de tamaño obtenida a través de DLS. Es importante destacar que en este caso no fue posible determinar el Pz de las muestras de QE-ME, ya que el AEA afectó la celda de medición, la cual está conformada por un polímero plástico. Por otro lado, la formulación propuesta presentó un pH de (4,69 ± 0,10), un valor algo superior a ME3 sin carga y adecuado para uso tópico. Con respecto a los valores de IR (1,3378 ± 0,0013) y CE (0,101 ± 0,010) mS cm^{-1}, éstos corroboraron que QE-ME es un sistema isotrópico y de tipo (o/w), respectivamente.

4.4.6 Estudio analítico de permeación

El estudio de la cinética de permeación en formulaciones para uso tópico ofrece importante información sobre la eficacia y seguridad de las mismas. Dado que la piel actúa como una barrera natural química, difusional y mecánica contra agentes externos, el estudio de permeación de una formulación o sus componentes a través de la piel o membranas sintéticas que la simulen, es importante para determinar su eficacia[251]. En particular, los aceites esenciales que se emplean comúnmente en formulaciones con fines terapéuticos, pueden penetrar a través de la piel principalmente por difusión pasiva, pudiendo influir en la permeabilidad cutánea de otros ingredientes bioactivos administrados con la formulación[252].

Para evaluar la cinética de permeación *in-vitro* de QE-ME a través de una membrana sintética que simula la piel, se determinó espectrofotométricamente la concentración de la misma a distintos tiempos y durante 1 h utilizando la celda *mini-Franz* descrita anteriormente en la sección 4.3.6.1. (pág. 133). La ecuación de regresión correspondiente a la curva de calibrado (Figura 4.8A) para la cuantificación de QE-ME fue A = 0,0989 [L mg^{-1}] c + 0,0415, donde A representa la absorbancia a 276 nm y c es la concentración de QE-ME en mg L^{-1}, obteniéndose un coeficiente de determinación (R^2)

[251] Reichling, J., Landvatter, U., Wagner, H., Kostka, K. H., & Schaefer, U. F. (2006). In vitro studies on release and human skin permeation of Australian tea tree oil (TTO) from topical formulations. *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics*, *64*(2), 222-228.
[252] Gabbanini, S., Lucchi, E., Carli, M., Berlini, E., Minghetti, A., & Valgimigli, L. (2009). In vitro evaluation of the permeation through reconstructed human epidermis of essentials oils from cosmetic formulations. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, *50*(3), 370-376.

de 0,9887. Entonces, a partir de las distintas concentraciones de QE-ME obtenidas a los distintos tiempos de permeación, se obtuvo el correspondiente perfil de permeación el cual se puede observar en la Figura 4.8B. A su vez, en la misma figura se muestra el perfil de permeación obtenido empleando la celda de difusión de Franz tradicional. Como puede observarse, en ambos casos la concentración de QE-ME aumentó en el compartimento aceptor a lo largo del tiempo analizado según la Ley de difusión de Fick y siguiendo una cinética de permeación de orden cero. Las ecuaciones de ajuste obtenidas se observan en la Tabla 4.6. A partir de estos resultados se calcularon las correspondientes constantes cinéticas de permeación (*Kp*) utilizando la Ecuación 3.2, Capítulo 3, sección 3.4.3.2 (pág. 110). Las *Kp* calculadas para QE-ME utilizando la celda *mini*-Franz propuesta y la celda de difusión de Franz tradicional (Tabla 4.6) permiten concluir que no existen diferencias estadísticamente significativas (p = 0,05) en las metodologías analizadas, y por ello el sistema *mini*-Franz desarrollado es una alternativa válida para estudiar el proceso de permeación en las muestras estudiadas.

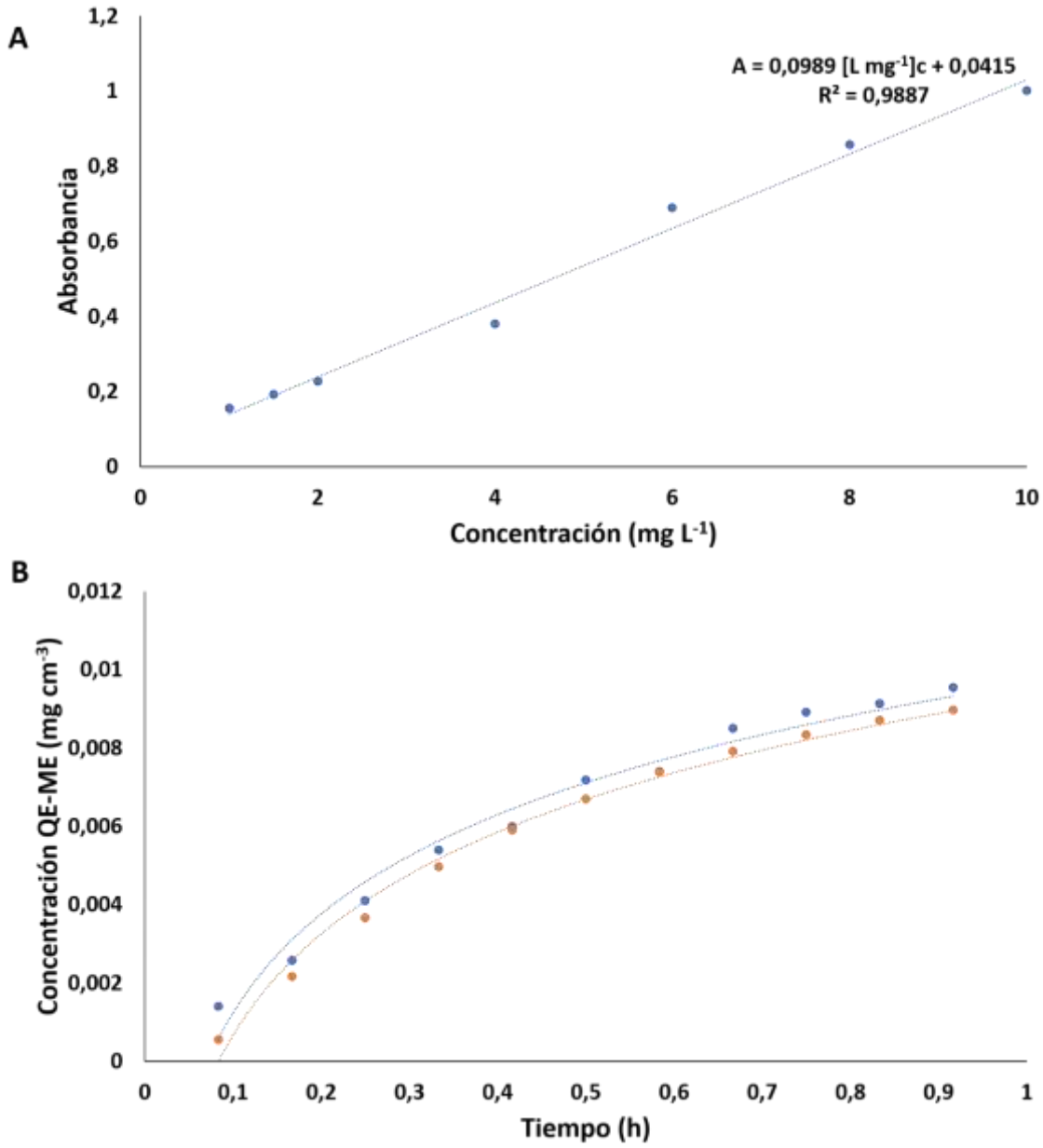


Figura 4.8. A) Curva de calibrado utilizada para cuantificar la concentración de QE-ME en la solución aceptora. B) Curvas de permeación de QE-ME (orden cero) obtenidas utilizando la celda de difusión mini-Franz propuesta (azul) y la celda de difusión de Franz tradicional (naranja). Cada punto representa la media (n=3) de tres determinaciones.

Tabla 4.6. Modelos y parámetros de ajuste para los perfiles de permeación de QE-ME y las correspondientes constantes de permeación obtenidas utilizando la celda de difusión mini-Franz propuesta y la celda de difusión de Franz tradicional.

	Ecuación de ajuste	**R^2**	***Kp* (cm h^{-1})**
***mini*-Franz**	c = 0,0037 ln(t) + 0,0093	0,9799	$5{,}96 \times 10^{-3} \pm 5{,}0 \times 10^{-7}$
Franz tradicional	c = 0,0036 ln(t) + 0,0096	0,9897	$5{,}81 \times 10^{-3} \pm 9{,}0 \times 10^{-6}$

Kp: constante de permeación; R^2: coeficiente de determinación

4.4.7 Estudios de actividad antiviral para BCoV

4.4.7.1 Ensayo de citotoxicidad

En primer lugar, se evaluó la viabilidad celular de monocapas de HRT-18, las cuales fueron expuestas a ME3 y QE-ME, sin diluir y diluidas (1:10) en medio de cultivo, utilizando como control células no expuestas. Los resultados obtenidos se observan en la Tabla 4.7 y en la Figura 4.9.

Tabla 4.7. Viabilidad de monocapas de células HRT-18 cuando son expuestas a la microemulsión sin carga (ME3) y cargada con QE (QE-ME), tanto diluídas (1:10) como sin diluir. Los datos representan la media y los desvíos estándar de tres ensayos independientes.

Muestra	**Viabilidad celular (%)**
Microemulsiones sin diluir	
ME3 (sin carga)	68,0 ± 0,1
QE-ME	90,0 ± 0,1
Microemulsiones diluidas (1:10)	
ME3 (sin carga)	75,0 ± 0,1

QE-ME	72,0 ± 0,1

Como puede apreciarse, la viabilidad celular, a excepción de ME3 sin diluir, en todos los casos fue mayor al 70%, lo que indica que las muestras no son citotóxicas (Grado 0) según la norma ISO 10993-5[253]. En particular, ME3 sin diluir es Grado 1, es decir, presenta citotoxicidad leve. Los porcentajes de viabilidad celular para ME3 y QE-ME fueron similares ($p > 0,05$) tanto sin diluir como diluidas, observándose que el ensayo con QE-ME sin diluir obtuvo un porcentaje de viabilidad del 90%. Dado estos resultados se procedió a continuar con los ensayos antivirales utilizando las microemulsiones sin diluir.

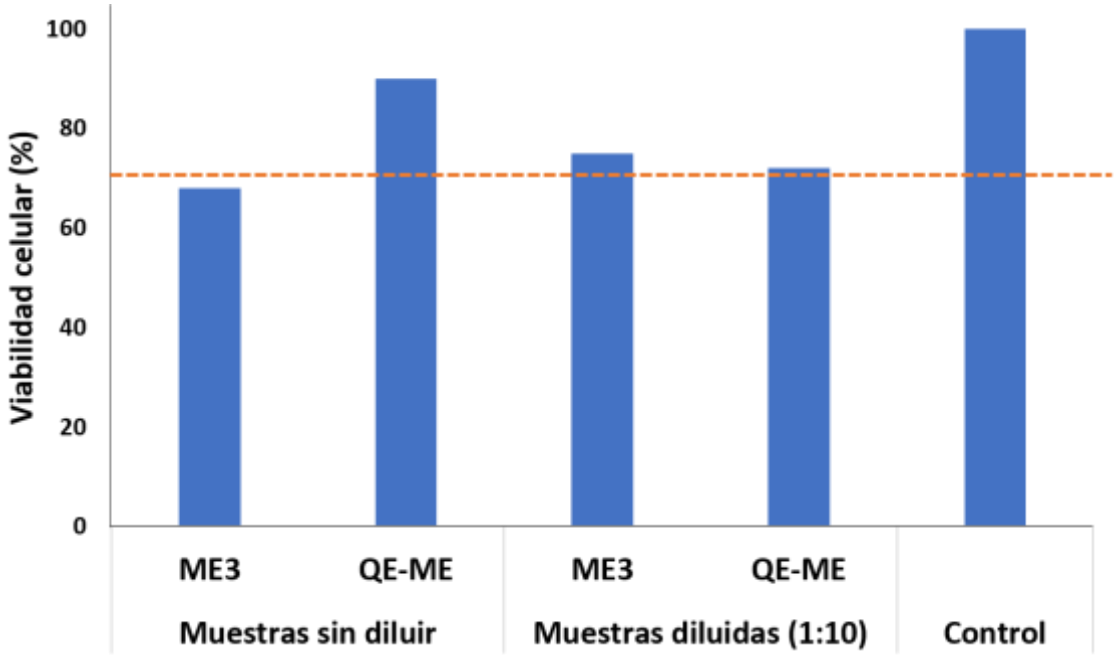


Figura 4.9. Porcentajes de viabilidad de células HRT-18 expuestas a microemulsiones sin diluir y diluidas (1:10). Las barras representan el porcentaje de células viables con respecto al control (100%) luego de 24 h de exposición a las distintas muestras. La línea punteada (naranja) representa el porcentaje de viabilidad celular a partir del cual las muestras no son consideradas citotóxicas.

4.4.7.2 Pre-tratamiento de las monocapas celulares con microemulsiones

[253] Standard, I. (2009). Biological evaluation of medical devices-Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity. *Geneve, Switzerland: International Organization for Standardization*, *10*, 9781570203558.

En este ensayo, las monocapas celulares de HRT-18 fueron expuestas a las microemulsiones antes de la infección con BCoV. Transcurridas 24 y 48 h de la infección, se observó una reducción significativa en los títulos virales en todos los grupos pre-tratados con microemulsiones, en comparación con el control positivo, es decir, monocapas celulares infectadas sin exposición previa a las microemulsiones ($p \leq 0,05$). Sin embargo, como puede verse en la Figura 4.10, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre la microemulsión sin carga (ME3) y cargada con quercetina (QE-ME), en ninguno de los tiempos analizados. Esto sugiere que bajo las condiciones de estudio, la presencia de quercetina en la microemulsión no mejoró la eficacia antiviral del pre-tratamiento frente a BCoV en términos de reducción del título viral, pudiéndose asociar dicho efecto al AEA que conforma la fase oleosa de la microemulsión, y el cual como se ha mencionado contiene una importante concentración de activos con capacidad antiviral.

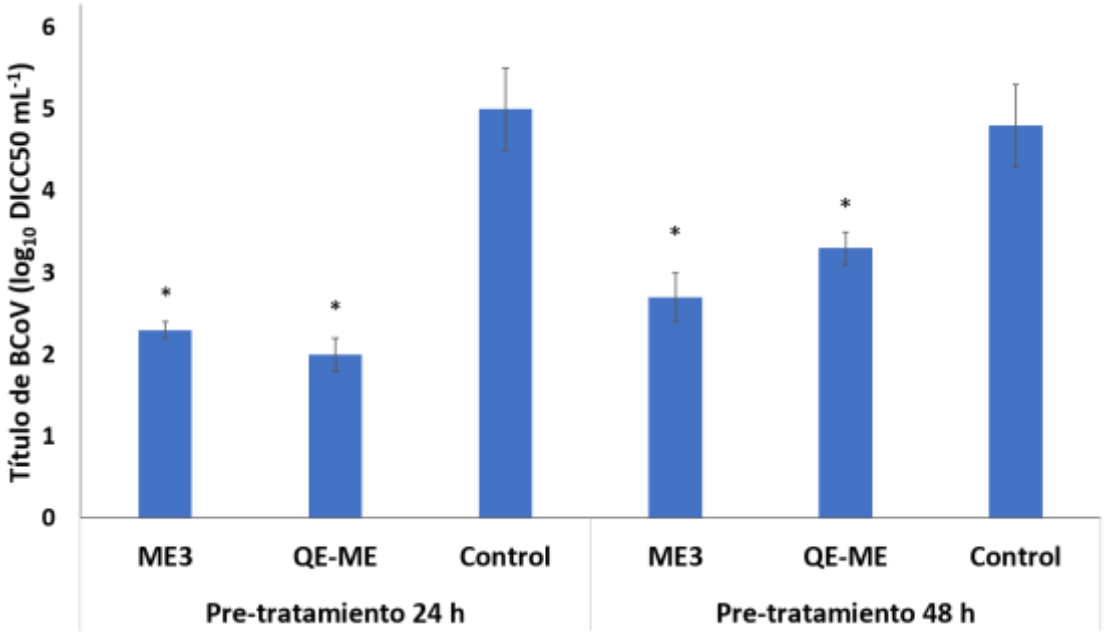


Figura 4.10. Títulos de BCoV luego de 24 y 48 h del pre-tratamiento de células HRT-18 durante 1 h con la microemulsión sin carga (ME3) y la microemulsión cargada con quercetina (QE-ME). Los datos representan la media y los desvíos estándar de tres ensayos independientes. El asterisco (*) indica que no se presentaron diferencias significativas entre las muestras ($p > 0,05$).

4.4.7.3 Adsorción viral de las microemulsiones

Como se mencionó previamente, el ensayo de adsorción viral (*binding*) tuvo como objetivo evaluar la capacidad de las microemulsiones de adsorber los viriones de BCoV. Como puede observarse en la Figura 4.11, las formulaciones evaluadas lograron reducir significativamente los títulos virales en comparación con el control no tratado con microemulsiones ($p \leq 0,05$). Esto sugiere que las microemulsiones poseen la capacidad de adsorber los viriones de BCoV de manera efectiva. Sin embargo, no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los títulos virales de BCoV obtenidos tras el tratamiento con las distintas microemulsiones, es decir, ME3 y QE-ME ($p > 0,05$). Estos resultados sugieren que, bajo las condiciones ensayadas, la presencia de quercetina no mejoró la adsorción viral de las microemulsiones en la concentración estudiada.

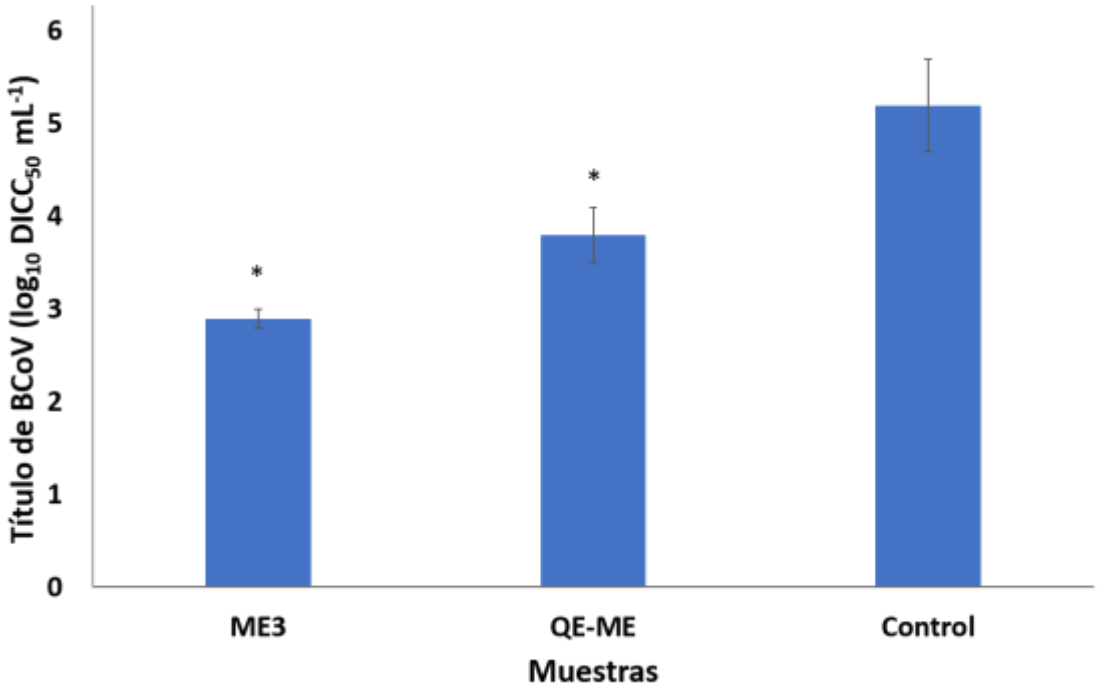


Figura 4.11. Títulos de BCoV en células HRT-18 luego de 30 min de adsorción viral con la microemulsión sin carga (ME3) y la microemulsión cargada con quercetina (QE-ME). Los datos representan la media y los desvíos estándar de tres ensayos independientes. El asterisco (*) indica que no se presentaron diferencias significativas entre las muestras ($p > 0,05$).

4.4.8 Estudios de actividad antiviral para BoHV-1

4.4.8.1 Ensayo de citotoxicidad

Los resultados de la viabilidad celular de las monocapas de MDBK expuestas a las microemulsiones sin diluir y diluidas (1:10) en medio de cultivo pueden observarse en la Tabla 4.8 y en la Figura 4.12.

Tabla 4.8. Viabilidad de monocapas de células MDBK cuando son expuestas a la microemulsión sin carga (ME3) y cargada con QE (QE-ME), tanto diluídas (1:10) como sin diluir. Los datos representan la media y los desvíos estándar de tres ensayos independientes.

Muestra	Viabilidad celular (%)
Microemulsiones sin diluir	
ME3 (sin carga)	72,0 ± 0,1
QE-ME	76,0 ± 0,1
Microemulsiones diluídas 1:10	
ME3 (sin carga)	96,0 ± 0,1
QE-ME	84,0 ± 0,1

Como se puede observar, todas las muestras presentaron un porcentaje de viabilidad celular superior al 70%, siendo para las muestras diluidas superior al 80%. En ambos casos, tanto para las microemulsiones diluidas como sin diluir, los porcentajes obtenidos indican que las muestras no presentan citotoxicidad (grado 0) según la norma ISO 10993-5[276]. Por otro lado, no hubo diferencias significativas ($p > 0,05$) respecto al control sin exposición tanto para las muestras sin diluir como para las diluidas. Por esta razón, se seleccionaron las microemulsiones ME3 y QE-ME sin diluir para continuar con los ensayos virales posteriores.

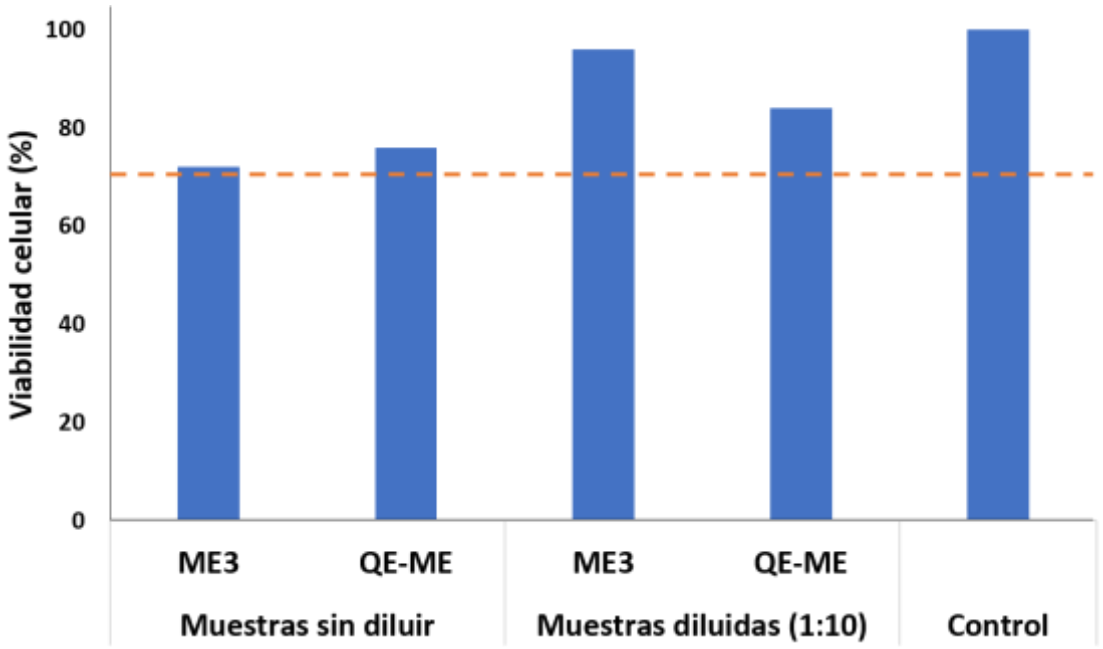


Figura 4.12. Porcentajes de viabilidad de células MDBK expuestas a microemulsiones sin diluir y diluidas (1:10). Las barras representan el porcentaje de células viables con respecto al control (100%) luego de 24 h de exposición a las distintas muestras. La línea punteada (naranja) representa el porcentaje de viabilidad celular a partir del cual las muestras no son consideradas citotóxicas.

4.4.8.2 Pre-tratamiento de las monocapas celulares con microemulsiones

En este ensayo, las monocapas celulares de MDBK fueron expuestas a las microemulsiones antes de la infección con BoHV-1. Luego de 24 h post-infección, se observó una reducción significativa en los títulos virales de BoHV-1 en todos los grupos pre-tratados con microemulsiones, comparados con el control positivo, es decir, monocapas de células infectadas sin exposición previa a las microemulsiones ($p \leq 0,05$). Sin embargo, como puede observarse en la Figura 4.13, no se hallaron diferencias estadísticamente significativas entre las distintas microemulsiones estudiadas, es decir, ME3 y QE-ME durante el tiempo de estudio. Esto sugiere que, bajo las condiciones analizadas, la presencia de quercetina en la microemulsión no mejoró la eficacia antiviral del pre-tratamiento frente a BoHV-1 en términos de reducción del título viral. Como ya se ha mencionado, el efecto antiviral observado podría asociarse a los distintos componentes activos del AEA que componen la fase oleosa de la microemulsión.

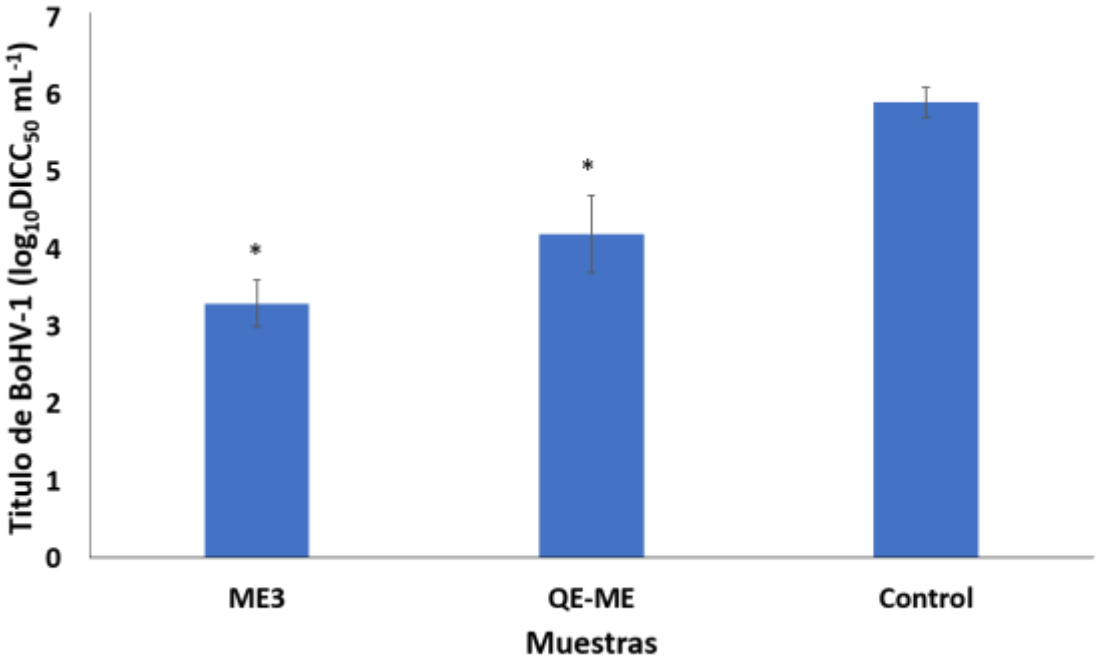


Figura 4.13. Títulos de BoHV-1 luego de 24 h del pre-tratamiento de células MDBK durante 1 h con la microemulsión sin carga (ME3) y la microemulsión cargada con quercetina (QE-ME). Los datos representan la media y los desvíos estándar de tres ensayos independientes. El asterisco (*) indica que no se presentaron diferencias significativas entre las muestras ($p > 0,05$).

4.4.8.3 Adsorción viral a las microemulsiones

Como ya se ha mencionado, este ensayo tiene como objetivo evaluar la capacidad de las microemulsiones de adsorber los viriones de virus, en este caso BoHV-1. Como puede observarse en la Figura 4.14, las microemulsiones estudiadas lograron reducir significativamente los títulos virales en comparación con el control no tratado con las formulaciones ($p \leq 0,05$). Sin embargo, no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los títulos virales de BoHV-1 obtenidos luego del tratamiento con las distintas microemulsiones ($p > 0,05$). Estos resultados sugieren que, bajos las condiciones de estudio, la presencia de quercetina no mejoró la adsorción antiviral de las formulaciones en la concentración estudiada.

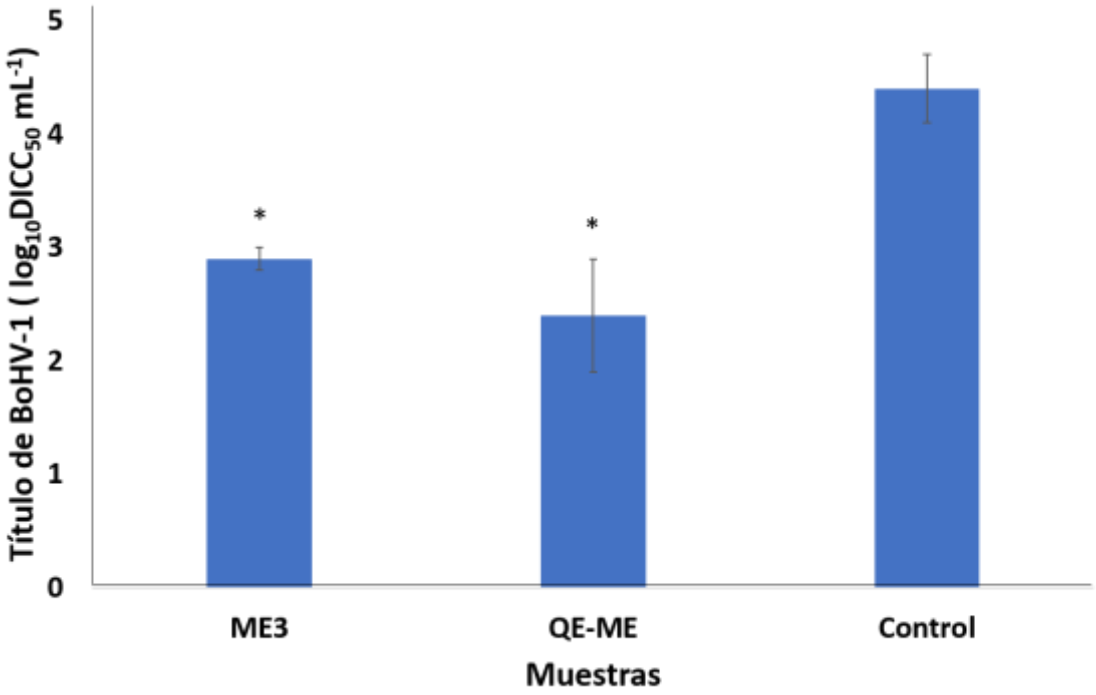


Figura 4.14. Títulos de BoHV-1 en células MDBK luego de 30 min de adsorción viral con la microemulsión sin carga (ME3) y la microemulsión cargada con quercetina (QE-ME). Los datos representan la media y los desvíos estándar de tres ensayos independientes. El asterisco (*) indica que no se presentaron diferencias significativas entre las muestras ($p > 0,05$).

4.4.9 Capacidad antioxidante de las microemulsiones

La Figura 4.15 muestra los resultados del ensayo de inhibición del radical DPPH para las muestras ME3 y QE-ME. Como puede observarse, ME3 no presenta una tendencia definida en su actividad antioxidante con el aumento de la concentración, alcanzando un porcentaje máximo de inhibición cercano al 30% dentro del rango de concentraciones evaluado (0,016 - 40,0 g L^{-1}). Por el contrario, QE-ME muestra una tendencia creciente en su capacidad de eliminación del radical DPPH, con valores de inhibición que aumentan progresivamente hasta alcanzar un máximo de inhibición cercano al 92% con la concentración más alta estudiada (40 g L^{-1}). Este resultado es comparable al obtenido con el control positivo, el ácido ascórbico (AA), el cual presentó un 93% de inhibición. Esto sugiere que QE-ME presenta una significativa capacidad antioxidante. Esta propiedad podría presentar diversas ventajas terapéuticas, incluyendo la protección celular contra el daño causado por los radicales libres y la reducción del estrés oxidativo, lo que puede mejorar el desempeño del sistema inmunológico, contribuyendo de esta manera al tratamiento de la infección.

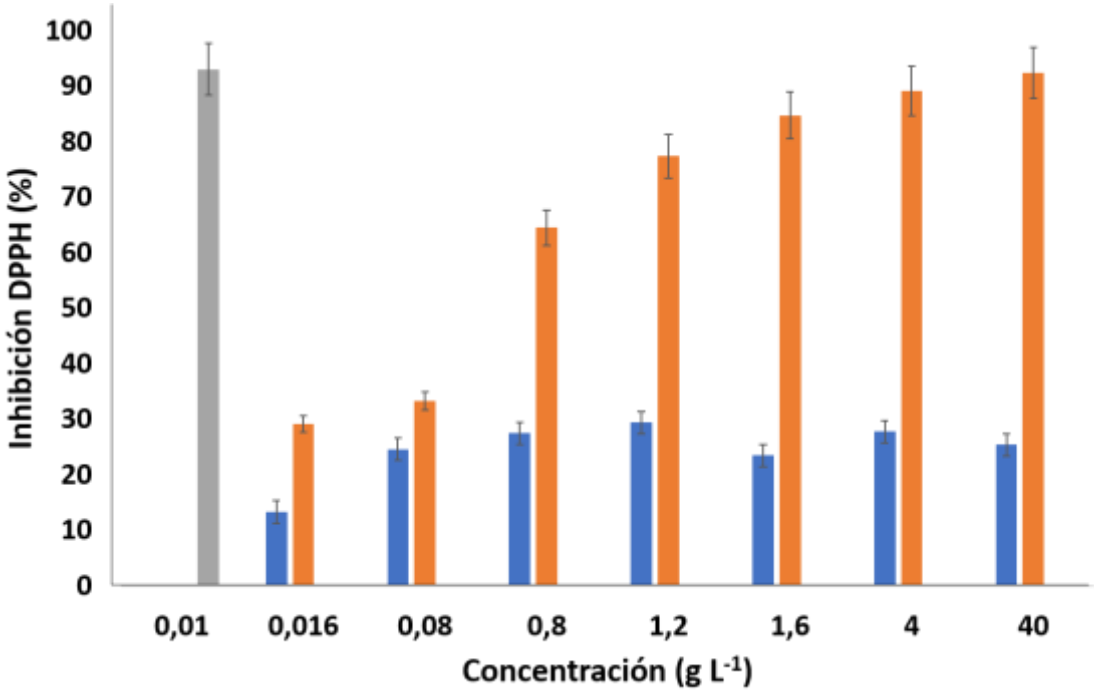


Figura 4.15. Porcentajes de inhibición del radical DPPH a distintas concentraciones de ME3 (azul) y QE-ME (naranja) con respecto al control de AA (gris). Cada barra representa el porcentaje de inhibición promedio acompañados de su correspondiente desviación estándar (n=3).

4.5 Conclusiones Parciales

En esta parte de la tesis se obtuvo exitosamente una nueva microemulsión (o/w) compuesta por activos naturales para el tratamiento tópico de infecciones virales causadas por betacoronavirus bovino y alfaherpesvirus bovino 1. En particular, se empleó aceite esencial de albahaca como fase oleosa debido a la demostrada actividad biocida de varios de sus componentes, y el polifenol quercetina debido a su actividad antioxidante. La construcción de diagramas de fase pseudoternarios permitieron encontrar la combinación óptima de componentes para formar una microemulsión adecuada para la carga de quercetina, mediante un procedimiento sencillo, rápido y de baja energía. Los resultados de la caracterización fisicoquímica demostraron que la microemulsión (o/w) cargada con quercetina presentó un tamaño de gota uniforme en la escala nanométrica y un valor de pH adecuado para su potencial aplicación tópica, entre otros. Además, se corroboró la estabilidad del sistema portador frente a cambios de temperatura (frío-calor) durante varios días, en los que se evaluó el tamaño de gota de la fase dispersa y su distribución de tamaño. Por otro lado, el estudio de permeación se realizó mediante una innovadora celda de difusión de Franz miniaturizada diseñada en el laboratorio con tecnología 3D y

de fácil acoplamiento a un detector UV-Vis, que permitió obtener información del proceso dinámico de permeación en tiempo real, utilizando menos volumen de muestra y solución aceptora, y en consecuencia residuos. Además, en este caso también se evitó el uso de solventes orgánicos comúnmente utilizados en la metodología tradicional, la cual utiliza técnicas separativas para la cuantificación de los activos de interés. La metodología *mini*-Franz propuesta se validó frente al método de difusión de Franz tradicional demostrando que no hubo diferencias estadísticamente significativas entre ambas metodologías. Posteriormente, los estudios *in-vitro* de actividad antiviral demostraron que la formulación propuesta disminuyó de manera estadísticamente significativa los títulos virales tanto de betacoronavirus bovino como de alfaherpesvirus bovino 1 luego de los ensayos de pre-tratamiento y de binding con respecto al control no expuesto a las microemulsiones. Sin embargo, no se observaron diferencias entre las microemulsiones cargadas con quercetina y las microemulsiones sin carga, lo que sugiere que la actividad biocida de la formulación estaría asociada a ciertos componentes del aceite esencial de albahaca, como ser linanol y 1-8 cineol, los que se encontraron, según el análisis cromatográfico realizado, en importante proporción en el aceite esencial utilizado como fase oleosa. Finalmente, se demostró la alta capacidad antioxidante de la formulación, la cual en este caso sí estuvo asociada casi exclusivamente a la quercetina, ya que la microemulsión sin carga presentó una actividad muy limitada y mucho inferior respecto a la microemulsión cargada con quercetina.

CAPÍTULO 5

Conclusiones generales

5.1 Conclusiones generales

El trabajo de investigación llevado a cabo en la presente tesis representa un aporte innovador en el campo de la química al abordar el desarrollo y estudio de nuevos sistemas nanoestructurados como las microemulsiones (o/w) como portadores de fármacos y biocidas que contribuyan a resolver importantes problemas que comprometen los sistemas de salud pública, como son la exposición solar excesiva y las infecciones causadas por patógenos oportunistas, y la producción animal, como ciertas enfermedades virales que afectan el ganado bovino.

En todos los casos se obtuvieron microemulsiones a partir de componentes biocompatibles aptos según la normativa vigente para uso tópico, tanto en productos farmacéuticos y de cuidado personal como en productos de uso veterinario. Un punto a destacar es que dichos componentes son accesibles en el mercado y presentan un costo relativamente bajo lo que favorece los costos de producción. A este aspecto se suma una síntesis simple y rápida, que utiliza un método de baja energía dado que este tipo de sistemas se forman espontáneamente y bajo condiciones de agitación suave y temperatura ambiente, lo que hace más factible el escalado a nivel de producción industrial. Además, estas condiciones contribuyen significativamente a una producción sostenible, de bajo impacto para el ambiente.

Por otro lado, todos los sistemas fueron caracterizados fisicoquímicamente de manera adecuada, y los resultados obtenidos permitieron confirmar la formación de microemulsiones a partir de la determinación del tamaño nanométrico de las gotas y su distribución uniforme, lo que eventualmente pudo ser confirmado por observación microscópica, el carácter isotrópico y el tipo de sistema (o/w). Asimismo, la estabilidad de las formulaciones fue corroborada mediante diversos ensayos como la determinación del potencial zeta, cuando fue posible, y estudios de estabilidad acelerada basados en centrifugación y ciclos frío-calor.

Dado que todas las formulaciones desarrolladas tienen por objetivo un potencial uso tópico, fueron abordados en cada caso los correspondientes estudios de permeación *in-vitro*, utilizando una membrana sintética de acetato de celulosa como modelo de piel. En todos los casos se optó por monitorear el proceso de permeación mediante espectrometría UV-Vis o de Fluorescencia molecular, lo que representa una alternativa más amigable para el ambiente que las tradicionales técnicas separativas utilizadas en este tipo de estudios. Además, desde el punto de vista analítico se plantearon mejoras

significativas en los sistemas de estudio basados en la celda de difusión de Franz. Así, se comenzó utilizando la celda tradicional y con muestreo manual para el monitoreo de la permeación del filtro químico solar benzofenona-3, obteniendo un resultado comparable en términos de constante de permeación del filtro en la microemulsión propuesta y con respecto a otros sistemas portadores de benzofenona-3 reportados en la literatura. A continuación, se trabajó en la automatización del procedimiento manual mediante la implementación de un sistema de flujo continuo automático y comandado mediante electrónica Arduino para el monitoreo en tiempo real de la permeación del antibiótico ciprofloxacina, concluyendo que este permea más rápidamente cuando se encuentra cargado en la microemulsión propuesta con respecto a su presencia en un medio no-organizado. Finalmente, se logró miniaturizar significativamente el procedimiento, desarrollando un novedoso sistema denominado *mini*-Franz. El mismo se aplicó al estudio de permeación de una microemulsión cargada con quercetina, consiguiendo reducir el volumen de muestra, soluciones y desechos generados, eliminando además el paso de muestreo y recuperación del volumen muestreado. En este caso se determinó la correspondiente constante de permeación y se validó la metodología comparando los resultados con aquellos obtenidos utilizando la celda de difusión de Franz tradicional. Esto demuestra como la utilización y combinación de diversos recursos alineados con la Química Analítica Verde pueden contribuir al desarrollo de metodologías más simples, rápidas, confiables y amigables con el ambiente.

En cuanto a los estudios de eficacia realizados sobre las formulaciones propuestas, en primer lugar, la microemulsión (o/w) cargada con el filtro químico solar benzofenona-3 demostró presentar un adecuado factor de protección solar *in-vitro*, por lo que resulta promisorio como futura plataforma de uso cosmético, incluso con capacidad para cargar otros activos. Además, el sistema portador demostró ejercer cierta protección frente a la temperatura, lo que fue evidenciado por el estudio cinético de termodegradación de benzofenona-3, y presentó una cinética de permeación adecuada para su función.

En segundo lugar, la microemulsión (o/w) cargada con el antibiótico de amplio espectro ciprofloxacina resultó efectiva frente a *S. aureus*, provocando una reducción significativa de la infección en piel y en fosas nasales de este patógeno en ratones, en comparación con el grupo control. Estos resultados sugieren que esta formulación puede resultar una alternativa de gran interés en el campo farmacéutico debido a la escasa oferta de productos de acción tópica destinados al tratamiento de infecciones causadas por este patógeno oportunista.

Finalmente, la microemulsión (o/w) basada en aceite esencial de albahaca y cargada con quercetina proporcionó resultados altamente prometedores para el tratamiento de infecciones causadas por betacoronavirus bovino y alfaherpesvirus bovino 1, lo que fue demostrado a partir de la reducción de los títulos virales luego del pre-tratamiento de células, así como mediante el ensayo de adsorción viral o *binding*. De esta manera, la formulación presenta óptimas condiciones para ser utilizada en el ámbito veterinario como potencial agente de prevención de la infección por estas dos especies virales. Además, los resultados de estos estudios pueden ser de gran importancia para el desarrollo de futuros tratamientos en humanos, ya que estos virus se utilizan durante las primeras etapas del estudio de formulaciones antivirales para su aplicación en dicha especie.

Por todo esto, los resultados obtenidos en esta Tesis evidencian el potencial de las microemulsiones como sistemas versátiles para la administración de principios activos con distintas aplicaciones, incluyendo protección solar, y el tratamiento de infecciones tanto bacterianas como virales. La estabilidad, biocompatibilidad y características de permeación las hacen sistemas portadores de alta eficacia para la administración tópica de un gran espectro de activos, contribuyendo además a minimizar los posibles efectos sistémicos. Esto las posicionan como alternativas prometedoras en el campo de la nanotecnología aplicada a la salud humana y animal y desde un enfoque sostenible.

Apéndice

Apéndice I

Valores de la composición de varios puntos del sistema ME del capítulo 2 utilizados en la construcción del diagrama de fases pseudoternario.

Tabla I.1 Composición (% p/p) de los componentes del sistema tipo ME (o/w) para la mezcla (TW80:ET) 1:1

Diagrama de fases pseudoternario Relación (1:1)											
(95:5)			**(90:10)**			**(80:20)**			**(50:50)**		
%Smix	**%MIP**	**%Agua**	**%Smix**	**%MIP**	**%Agua**	**%Smix**	**%MIP**	**%Agua**	**%Smix**	**%MIP**	**%Agua**
86,12	4,89	8,99	81,87	9,05	9,08	72,49	18,49	9,02	47,89	47,41	4,70
79,02	4,48	16,50	75,06	8,30	16,64	66,50	16,96	16,55	-	-	-
73,00	4,14	22,86	69,29	7,66	23,05	63,85	16,28	19,86	-	-	-
67,83	3,85	28,32	64,35	7,12	28,54	-	-	-	**(30:70)**		
63,34	3,59	33,06	60,06	6,64	33,30	-	-	-	**%Smix**	**%MIP**	**%Agua**
59,41	3,37	37,22	56,31	6,23	37,46	**(70:30)**			29,48	65,82	4,70
55,94	3,17	40,88	53,00	5,86	41,14	**%Smix**	**%MIP**	**%Agua**	-	-	-
52,86	3,00	44,15	50,06	5,54	44,40	66,28	29,02	4,70	-	-	-
50,09	2,84	47,07	-	-	-	63,31	27,71	8,98	-	-	-
47,60	2,70	49,70	-	-	-	-	-	-	**(20:80)**		
38,13	2,16	59,71	-	-	-	-	-	-	%Smix	%MIP	%Agua
31,80	1,80	66,40	-	-	-	**(60:40)**			20,17	75,15	4,68
27,27	1,55	71,18	-	-	-	**%Smix**	**%MIP**	**%Agua**	-	-	-
23,87	1,35	74,77	-	-	-	57,45	37,85	4,71	-	-	-
21,23	1,20	77,57	-	-	-	54,87	36,14	8,99	-	-	-
19,11	1,08	79,81	-	-	-	-	-	-	-	-	-
17,38	0,99	81,64	-	-	-	-	-	-	**(10:90)**		
15,93	0,90	83,16	-	-	-	-	-	-	**%Smix**	**%MIP**	**%Agua**
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Tabla I.2 Composición (% p/p) de los componentes del sistema tipo ME (o/w) para la mezcla (TW80:ET) 2:1.

Diagrama de fases pseudoternario Relación (2:1)											
(95:5)			(90:10)			(80:20)			(50:50)		
%Smix	%MIP	%Agua	%Smix	%MIP	%Agua	%Smix	%MIP	%Agua	%Smix	%MIP	%Agua
86,39	4,54	9,08	82,08	8,95	8,97	72,44	18,53	9,04	47,51	47,51	4,69
79,20	4,16	16,64	75,33	8,21	16,46	66,43	16,99	16,58	45,39	45,65	8,96
73,11	3,84	23,05	69,60	7,59	22,81	61,35	15,69	22,96	-	-	-
67,90	3,57	28,53	64,68	7,05	28,27	59,09	15,11	25,80	(30:70)		
63,38	3,33	33,29	60,41	6,59	33,00	-	-	-	%Smix	%MIP	%Agua
54,33	2,85	42,81	45,42	4,95	49,63	(70:30)			28,82	66,44	4,74
47,55	2,50	49,96	36,39	3,97	59,64	%Smix	%MIP	%Agua	27,51	63,43	9,05
45,28	2,38	52,34	30,35	3,31	66,33	66,24	29,02	4,74	26,32	60,69	12,99
44,23	2,32	53,44	26,04	2,84	71,12	63,24	27,71	9,05	-	-	-
43,23	2,27	54,50	22,79	2,49	74,72	60,50	26,51	12,99	(20:80)		
42,27	2,22	55,51	20,27	2,21	77,52	-	-	-	%Smix	%MIP	%Agua
38,04	2,00	59,96	18,25	1,99	79,76	(60:40)			18,85	76,40	4,75
31,71	1,67	66,63	16,59	1,81	81,60	%Smix	%MIP	%Agua	18,80	76,19	5,00
27,18	1,43	71,39	15,22	1,66	83,13	57,21	38,08	4,72	-	-	-
23,78	1,25	74,97	-	-	-	54,63	36,36	9,01	-	-	-
21,14	1,11	77,75	-	-	-	52,28	34,80	12,93	-	-	-
19,03	1,00	79,97	-	-	-	-	-	-	(10:90)		
17,30	0,91	81,79	-	-	-	-	-	-	%Smix	%MIP	%Agua
15,86	0,83	83,31	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Tabla I.3 Composición (% p/p) de los componentes del sistema tipo ME (o/w) para la mezcla (T80:ET) 3:1.

Diagrama de fases pseudoternario Relación (3:1)			
(95:5)	(90:10)	(80:20)	(50:50)

%Smix	%MIP	%Agua	%Smix	%MIP	%Agua	%Smix	%MIP	%Agua	%Smix	%MIP	%Agua
86,29	4,67	9,04	81,80	9,23	8,97	72,72	18,25	9,03	47,56	47,73	4,71
79,20	4,16	16,64	75,33	8,21	16,46	66,43	16,99	16,58	45,39	45,65	8,96
79,13	4,28	16,59	75,05	8,47	16,46	66,69	16,73	16,57	45,42	45,59	8,99
73,07	3,96	22,97	69,36	7,83	22,81	61,59	15,45	22,96	43,47	43,62	12,91
67,87	3,67	28,45	64,46	7,28	28,26	57,21	14,35	28,43	-	-	-
63,36	3,43	33,20	60,21	6,80	32,99	-	-		-	-	-
47,57	2,58	49,86	45,27	5,11	49,62		**(70:30)**			**(30:70)**	
38,08	2,06	59,86	36,27	4,09	59,63	**%Smix**	**%MIP**	**%Agua**	**%Smix**	**%MIP**	**%Agua**
31,74	1,72	66,54	30,26	3,42	66,33	66,55	28,74	4,71	28,86	66,42	4,72
27,22	1,47	71,31	25,95	2,93	71,12	63,55	27,45	9,00	27,56	63,42	9,01
23,82	1,29	74,89	22,72	2,57	74,71	60,82	26,26	12,92	-	-	-
21,18	1,15	77,68	20,21	2,28	77,51	58,31	25,18	16,51		**(20:80)**	
19,06	1,03	79,91	18,19	2,05	79,75	56,00	24,18	19,82	**%Smix**	**%MIP**	**%Agua**
17,33	0,94	81,73	16,54	1,87	81,59	-	-	-	19,93	75,37	4,70
15,89	0,86	83,25	15,17	1,71	83,12		**(60:40)**		19,03	71,99	8,98
-	-	-	-	-	-	**%Smix**	**%MIP**	**%Agua**	-	-	-
-	-	-	-	-	-	57,06	38,27	4,67		**(10:90)**	
-	-	-	-	-	-	54,51	36,56	8,92	**%Smix**	**%MIP**	**%Agua**
-	-	-	-	-	-	52,18	35,00	12,81	-	-	-
-	-	-	-	-	-	50,05	33,57	16,38	-	-	-
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Apéndice II

Valores de la composición de varios puntos del sistema ME del capítulo 4 utilizados en la construcción del diagrama de fases pseudoternario.

Tabla II.1. Composición (% p/p) de los componentes del sistema tipo ME (o/w) para la mezcla (CR:ET) 1:1.

Diagrama de fases pseudoternario Relación (1:1)											
(95:5)			(90:10)			(80:20)			(60:40)		
%Smix	%AEA	%Agua	%Smix	%AEA	%Agua	%Smix	%AEA	%Agua	%Smix	%AEA	%Agua
63,02	4,05	32,93	60,08	6,87	33,06	53,30	13,63	33,08	57,02	38,25	4,73
47,41	3,05	49,54	45,15	5,16	49,69	40,05	10,24	49,71	54,44	36,52	9,04
38,00	2,44	59,56	36,17	4,14	59,70	32,08	8,20	59,72	52,08	34,94	12,97
31,70	2,04	66,26	30,16	3,45	66,39	26,75	6,84	66,41	49,93	33,49	16,58
27,20	1,75	71,05	25,87	2,96	71,17	22,94	5,87	71,19	-	-	-
23,81	1,53	74,65	22,65	2,59	74,76	20,08	5,13	74,78	(50:50)		
21,18	1,36	77,46	20,14	2,30	77,56	-	-	-	%Smix	%AEA	%Agua
19,07	1,23	79,21	18,13	2,07	79,80	(70:30)			47,29	47,20	4,02
17,34	1,11	81,54	16,48	1,88	81,63	%Smix	%AEA	%Agua	-	-	-
15,90	1,02	83,08	15,11	1,73	83,16	66,30	28,99	4,71	-	-	-
-	-	-	-	-	-	63,31	27,68	9,00	(30:70)		
-	-	-	-	-	-	60,59	26,49	12,92	%Smix	%AEA	%Agua
-	-	-	-	-	-	58,08	25,40	16,52	-	-	-
-	-	-	-	-	-	55,78	24,39	19,83	(10:90)		
-	-	-	-	-	-	53,65	23,46	22,89	-	-	-
-	-	-	-	-	-	51,68	22,60	25,72	-	-	-
-	-	-	-	-	-	49,85	21,80	28,35	-	-	-
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Tabla II.2 Composición (% p/p) de los componentes del sistema tipo ME (o/w) para la mezcla (CR:ET) 2:1.

Diagrama de fases pseudoternario Relación 2:1			
(95:5)	(90:10)	(80:20)	(70:30)

%Smix	%AEA	%Agua	%Smix	%AEA	%Agua	%Smix	%AEA	%Agua	%Smix	%AEA	%Agua
85,31	5,68	9,01	81,39	9,62	8,99	72,35	18,62	9,03	63,52	27,39	9,09
78,26	5,21	16,53	74,67	8,82	16,50	66,35	17,08	16,57	60,76	26,19	13,04
72,29	4,81	22,90	68,98	8,15	22,87	61,28	15,77	22,95	58,23	25,10	16,67
67,16	4,47	28,37	64,10	7,57	28,33	56,92	14,65	28,43	49,91	21,52	28,57
62,71	4,17	33,12	59,86	7,07	33,07	53,14	13,68	33,18	46,59	20,08	33,33
53,80	3,58	42,62	44,98	5,32	49,70	39,90	10,27	49,83	34,94	15,06	50,00
47,11	3,13	49,76	36,03	4,26	59,71	31,95	8,22	59,83	27,95	12,05	60,00
44,88	2,99	52,14	30,05	3,55	66,40	26,63	6,85	66,51	-	-	-
44,88	2,92	53,25	25,77	3,05	71,18	22,84	5,88	71,29	**60:40**		
42,85	2,85	54,30	22,56	2,67	74,78	19,99	5,14	74,87	**%Smix**	**%AEA**	**%Agua**
41,90	2,79	55,31	20,06	2,37	77,57	17,77	4,57	77,66	57,05	38,23	4,73
37,72	2,51	59,77	18,06	2,13	79,81	15,99	4,12	79,89	54,47	36,50	9,02
31,46	2,09	66,45	16,42	1,94	81,64	14,54	3,74	81,71	49,96	33,48	16,55
26,98	1,79	71,23	15,05	1,78	83,17	13,33	3,43	83,24	-	-	-
23,61	1,57	74,82	-	-	-	-	-	-	**(50:50)**		
20,99	1,40	77,61	-	-	-	-	-	-	**%Smix**	**%AEA**	**%Agua**
18,90	1,26	79,84	-	-	-	-	-	-	47,39	47,86	4,75
17,18	1,14	81,67	-	-	-	-	-	-	45,24	45,69	9,07
15,75	1,05	83,20	-	-	-	-	-	-	**(30:70)**		
-	-	-	-	-	-	-	-	-	**%Smix**	**%AEA**	**%Agua**
-	-	-	-	-	-	-	-	-	29,04	66,24	4,71

Apéndice III

Productividad durante la tesis

III.1 Trabajos publicados

- **"Confocal Raman spectroscopy applied to microemulsions and nanoemulsions".** Cintia J. Fernandez, Verónica Volpe, Analía Guerrero, Danielle Silva do Nascimento, Marcos Grünhut. (2025). Current Opinion in Colloid & Interface Science, (2025) 101932.

- **"Ciprofloxacin loaded o/w microemulsion against *Staphylococcus aureus*. Analytical and biological studies for topical and intranasal administration".** Verónica Volpe, Mónica N. Giacomodonato, Daniel O. Sordelli, Matías Insausti, Fernanda R. Buzzola, Marcos Grünhut. Journal of Drug Delivery Science and Technology 57 (2020) 101705.

- **"Confocal Raman spectroscopy assisted by chemometric tools: A green approach for classification and quantification of octyl p-methoxycinnamate in oil-in-water microemulsions".** Danielle Silva do Nascimento, Verónica Volpe, Cintia J. Fernandez, Gerardo M. Oresti, Lorna Ashton, Marcos Grünhut. Microchemical Journal 184 (2023) 108151.

- **"On line kinetic analysis of permeation profiles for UV filter loaded microemulsions using an automatic system with spectroscopic detection and a chemometric approach".** Danielle Silva do Nascimento, Verónica Volpe, Matías Insausti, Marcos Grünhut. RSC Adv., 2021, 11, 15528

- **"Octyl p-methoxycinnamate loaded microemulsion based on Ocimum basilicum essential oil. Characterization and analytical studies for potential cosmetic applications".** Verónica Volpe, Danielle Silva Nascimento, Matías

Insausti, Marcos Grünhut. Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects, 546 (2018) 285-296

III.2 Presentaciones a congresos relacionados con la tesis

- **6° Reunión Internacional de Ciencias Farmacéuticas, (RICiFa 2020+1)**, Córdoba, 10 al 12 de noviembre de 2021. Modalidad Virtual. "Quercetin loaded oil in water microemulsion. Characterization and evaluation of the antiviral activity against Bovine alphaherpesvirus 1 ", Verónica Volpe, Sandra E. Perez, Guillermina Dolcini, Fernanda R. Buzzola y Marcos Grünhut.

- **6° Reunión Internacional de Ciencias Farmacéuticas, (RICiFa 2020+1)**, Córdoba, 10 al 12 de noviembre de 2021. Modalidad Virtual. "Benzophenone-3 loaded o/w micromulsion for a topical use as sunscreen. Thermal stability and permeation analytical studies", Verónica Volpe, Damián A. Uriarte, Claudia Domini, Mariano E. Garrido y Marcos Grünhut.

- **10° Congreso Argentino de Química Analítica**, Santa Rosa, 17 al 20 de septiembre de 2019. "Diseño y desarrollo de un sistema acoplado a detector para el estudio de permeación en tiempo real de una microemulsión portadora de quercetina". Verónica Volpe, Fernanda Buzzola, Daniel O. Sordelli, Matías Insausti y Marcos Grünhut. Libro de resúmenes / María Soledad García ... [et al.]; compilado por Marcelo Wagner; Jorgelina Heredia Zaldarriaga; María Isabel Curti - 1a ed. – Santa Rosa: Universidad Nacional de la Pampa, 2019, pag. 97. ISBN 978-950-863-375-0.

- **5° Reunión Internacional de Ciencias Farmacéuticas**, La Punta, San Luis, 14 al 16 de noviembre de 2018. "Microemulsión portadora de ciprofloxacina de acción tópica ", Verónica Volpe, Mónica Giacomodonato, Fernanda Buzzola , Matías Insausti, Daniel Sordelli y Marcos Grünhut.

- **9° Congreso Argentino de Química Analítica**, Río Cuarto, 7 al 10 de noviembre de 2017. "Obtención y caracterización de una microemulsión o/w de acción antimicótica. Sistema automático en línea con detección fluorescente para el estudio de permeación". Verónica Volpe, Matías Insausti y Marcos Grünhut. Libro de resúmenes / M. E. Lorenzo ... [et al.] ; compilado por Héctor Fernández ; María Alicia Zon. - 1a ed. - Río Cuarto: UniRío Editora, 2017, pag. 114. ISBN 978-987-688-238-5.

- **9° Congreso Argentino de Química Analítica**, Río Cuarto, 7 al 10 de noviembre de 2017. Sistema automatizado para el estudio de permeación in vitro monitoreado por fluorescencia". Danielle Silva Nascimento, Verónica Volpe, Matías Insausti y Marcos Grünhut. Libro de resúmenes / M. E. Lorenzo ... [et al.] ; compilado por Héctor Fernández ; María Alicia Zon. - 1a ed . - Río Cuarto: UniRío Editora, 2017, pag. 83. ISBN 978-987-688-238-5.

- **31° Congreso Argentino de Química**. Buenos Aires, 25 al 28 de octubre de 2016. "Obtención, caracterización y estudio analítico de una microemulsión o/w portadora de un filtro químico solar y de acción biocida". Verónica Volpe, Danielle S. do Nascimento, Julia Raunicher, Matías Insausti, Beatriz S. F. Band y Marcos Grünhut. The Journal of The Argentine Chemical Society 103 (1-2) 2016, 10-34. ISSN: 1852 – 1207.

III.3 Otras presentaciones a congresos

- **11° Congreso Argentino de Química Analítica**, Corrientes, 30 de noviembre al 03 de diciembre de 2021. Modalidad virtual."Determinación enzimática de glucosa y glicerol como indicadores de la dinámica de fermentación en kéfir de agua obtenido mediante un minibiorreactor lab-made" Marilina Lang, Verónica Volpe, Sebastián Costa, Belén Perez Adassus, Verónica Lassalle y Marcos Grünhut. Libro de resúmenes / Sergio Sebastián Samoluk … [et al.]; 1a ed

compendiada. - Paso de la Patria: Roberto Gerardo Pellerano, 2022, pag. 155, ISBN 978-987-88-5110-5.

- **10° Congreso Argentino de Química Analítica**, Santa Rosa, 17 al 20 de septiembre de 2019. "Nanotubos de carbono funcionalizados con 3-aminopropiltrietoxisilano para la extracción-preconcentración de octil p-metoxicinamato". Cintia J. Fernandez, Verónica Volpe, Danielle Silva do Nascimento y Marcos Grünhut. Libro de resúmenes / María Soledad García ... [et al.] ; compilado por Marcelo Wagner; Jorgelina Heredia Zaldarriaga; María Isabel Curti - 1a ed . – Santa Rosa: Universidad Nacional de la Pampa, 2019, pag. 113. ISBN 978-950-863-375-0.

- **31° Congreso Argentino de Química**. Buenos Aires, 25 al 28 de octubre de 2016. "Contaminantes orgánicos persistentes en la ciudad de Bahía Blanca y región". Verónica Volpe y Norma B. Tombesi. The Journal of The Argentine Chemical Society 103 (1-2) 2016, 01-15. ISSN: 1852 – 1207.

- **VI Congreso Bianual PROIMCA**. Bahía Blanca, 6 al 8 de septiembre de 2017. "Relevamiento de estudios sobre contaminantes orgánicos persistentes (COPs) en aire de la ciudad de Bahía Blanca y región". Verónica Volpe, Monica B. Alvarez y Norma B. Tombesi.

- **IV Congreso Bianual PRODECA**. Bahía Blanca, 6 al 8 de septiembre de 2017. "Relevamiento de estudios sobre COPs en ambientes acuáticos de la ciudad de Bahía Blanca y región". Verónica Volpe, Monica B. Alvarez y Norma B. Tombesi.