

Permeación en piel humana de una nanoemulsión de ftalocianina de aluminio clorada para la optimización de tratamientos tópicos de leishmaniasis cutánea

Human Skin Permeation of a Chloroaluminum Phthalocyanine Nanoemulsion for Optimization of Topical Cutaneous Leishmaniasis Formulations

Permeação em pele humana de uma nanoemulsão de ftalocianina de alumínio clorada para a otimização de tratamentos tópicos de leishmaniose cutânea

Victoria Eugenia Ospina MSc. (s),¹ Julio Cesar Mantilla,² Carlos Arturo Conde MSc. PhD,³ Patricia Escobar MSc. PhD¹

Recibido: 16 de febrero de 2013 • Aceptado: 4 de febrero de 2014

Doi: [dx.doi.org/10.12804/revsalud12.2.2014.05](https://doi.org/10.12804/revsalud12.2.2014.05)

Para citar este artículo: Ospina VE, Mantilla JC, Conde CA, Escobar P. Permeación en piel humana de una nanoemulsión de ftalocianina de aluminio clorada para la optimización de tratamientos tópicos de leishmaniasis cutánea. Rev Cienc Salud. 2014;12(2):195-211. doi: [dx.doi.org/10.12804/revsalud12.2.2014.05](https://doi.org/10.12804/revsalud12.2.2014.05)

Resumen

Introducción: Las nanoemulsiones son excelentes sistemas de transporte y entrega de fármacos. La ftalocianina de aluminio clorada (PcAlCl) en terapia fotodinámica constituye una alternativa de tratamiento en leishmaniasis cutánea. **Objetivo:** Determinar la difusión y retención en piel humana de la PcAlCl contenida en una nanoemulsión (nano-PcAlCl) para su optimización en formulaciones tópicas. **Materiales y métodos:** Se prepararon y caracterizaron físico-químicamente dos formulaciones (nano-PcAlCl y solución-PcAlCl) y sus vehículos sin-PcAlCl. La permeación se determinó en ensayos en celdas de difusión de Franz y la retención por el método de la cinta adhesiva. La concentración de PcAlCl fue determinada fluorométricamente (nM/cm²). Biopsias de piel fueron analizadas histotécnicamente. **Resultados:** El tamaño promedio, el potencial Z y el índice de polidispersión de la nano-PcAlCl en agua fue de 132,9 nm, -19,23 y 0,14 y diluida en PBS fue 125,33 nm, -13,69 y 0,139. Las concentraciones de PcAlCl se mantuvieron estables. La PcAlCl no atravesó la piel y fue retenida en sus capas, en estrato córneo y epidermis+dermis con valores de 44,17 nM y 8,48 nM postratamiento con nano-PcAlCl, y 96,90 nM y 9,80 nM

1 Centro de Investigación en Enfermedades Tropicales (Cintrop-UIS), Departamento de Ciencias Básicas, Escuela de Medicina, Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, Colombia. Correspondencia: pescobarwww@yahoo.co.uk

2 Grupo de investigación en Patología Estructural, Funcional y Clínica, Departamento de Patología, Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, Colombia.

3 Grupo de investigación en Neurociencias y Comportamiento UIS-UPB, Bucaramanga, Colombia.

postratamiento con solución-PcAlCl. Esta última promovió mayor retención en estrato córneo y ambas formulaciones promovieron similar retención en epidermis+dermis. Se observó desprendimiento del estrato córneo y fragmentación del colágeno. *Conclusión:* La PcAlCl no atravesó la piel, se retuvo en estrato córneo y epidermis+dermis. Se sugiere realizar ensayos de permeación utilizando piel humana desprovista de estrato córneo y ensayos de distribución en animales con leishmaniasis cutánea.

Palabras clave: nanoemulsión, ftalocianina de aluminio clorada, permeación en piel, celdas de Franz, leishmaniasis cutánea.

Abstract

Introduction: The nanoemulsions constitute excellent drug delivery systems for carrying and delivering active drugs. Chloroaluminum phthalocyanine (ClAlPc) in photodynamic therapy constitutes an interesting alternative in cutaneous leishmaniasis treatment. *Objective:* To determine the diffusion and retention of ClAlPc contained in a nanoemulsion (nano-ClAlPc) in human skin membranes for optimization of topical formulations. *Materials and methods:* Two formulations (ClAlPc-nano- and ClAlPc-solution) and vehicles without ClAlPc were prepared and physicochemical characterized. The permeation was tested in Franz-diffusion cells and the retention by the tape stripping method. ClAlPc concentration was determined fluorometrically (nM/cm²). Skin biopsies were analyzed by histologic techniques. *Results:* The ClAlPc-nano average size, zeta potential and polydispersity index diluted in water was 132.9 nm, -19.23 and 0.14 and diluted in phosphate-buffer-saline was 25.33 nm, -13.69 and 0.139. ClAlPc maintains its stability in each formulation. ClAlPc was unable to pass completely through the skin; it was retained in the different skin layers. A ClAlPc retention in stratum corneum and epidermis+dermis was observed with values of 44.17 nM and 8.48 nM after ClAlPc-nano treatment and 96.90 nM and 9.80 nM after ClAlPc-solution treatment. The ClAlPc-solution promoted greater retention in stratum corneum and both formulations showed similar ClAlPc-retention in epidermis+dermis. Histological changes as stratum corneum detachment and collagen-fragmentation were observed. *Conclusion:* ClAlPc was not able to cross completely the skin, it was retained in stratum corneum and epidermis+dermis Human permeation test using skin membranes without stratum corneum, and distribution assays in cutaneous leishmaniasis-infected animals, are suggested.

Keywords: Nanoemulsion, chloroaluminum phthalocyanine, skin permeation, Franz diffusion cells, cutaneous leishmaniasis.

Resumo

Introdução: as nanoemulsões são excelentes sistemas de transporte e entrega de fármacos. A ftalocianina de alumínio clorada (PcAlCl) em terapia fotodinâmica constitui uma alternativa de tratamento em leishmaniose cutânea. *Objetivo:* determinar a difusão e retenção em pele humana da PcAlCl contida em uma nanoemulsão (nano-PcAlCl) para sua otimização em formulações tópicas. *Materiais e métodos:* se prepararam e caracterizaram físico-quimicamente duas formulações (nano-PcAlCl e solução-PcAlCl) e seus veículos sem-PcAlCl. A permeação determinou-se em

ensaios em celas de difusão de Franz e a retenção pelo método da fita adesiva. A concentração de PcAlCl foi determinada fluorometricamente (nM/cm^2). Biopsias de pele foram analisadas histotécnicamente. *Resultados*: o tamanho médio, o potencial Z e o índice de polidispersão da nano-PcAlCl em água foi de 132,9 nm, -19,23 e 0,14 e diluída em PBS foi 125,33 nm, -13,69 e 0,139. As concentrações de PcAlCl mantiveram-se estáveis. A PcAlCl não atravessou a pele, foi retido em suas capas. A PcAlCl foi retida em estrato córneo e epiderme+derme com valores de 44,17 nM e 8,48 nM pós-tratamento com nano-PcAlCl e 96,90 nM e 9,80 nM pós-tratamento com solução-PcAlCl. A solução-PcAlCl promoveu maior retenção em estrato córneo e ambas as formulações promoveram similar retenção em epiderme+derme. Observou-se desprendimento do estrato córneo e fragmentação do colágeno. *Conclusão*: a PcAlCl não atravessou a pele; reteve-se em estrato córneo e epiderme+derme. Sugere-se realizar ensaios de permeação utilizando pele humana desprovida de estrato córneo e ensaios de distribuição em animais com leishmaniose cutânea.

Palavras-chave: Nanoemulsão, ftalocianina de alumínio clorada, permeação em pele, celas de Franz, leishmaniose cutânea.

Introducción

Las leishmaniasis son un conjunto de enfermedades producidas por diferentes especies de *Leishmania*. Es endémica en las regiones tropicales y subtropicales de 88 países en 4 continentes, se considera un grave problema de salud pública a nivel mundial debido al aumento de casos en los últimos años (1). La leishmaniasis cutánea (LC) es la forma clínica más frecuente, se calcula una prevalencia mundial de 20 millones de casos y se cree que la incidencia anual oscila entre 1,5 y 2 millones (1). En Colombia, en la década de los noventa se notificaron alrededor de 6500 casos nuevos, y en los años 2000 esta cifra superó los 14000 casos nuevos (2).

Las alternativas terapéuticas actuales contra la leishmaniasis se basan en la aplicación sistémica de antimoniales pentavalentes (Glucontime® o Pentostam®), cuya dosis se ha ido aumentando para mantener su eficacia (3). Otros fármacos utilizados son la anfotericina B (Fungizone®), el isotianato de pentamidina (Pentacarinat®), formulaciones lipídicas de anfotericina B y miltefosine (3-5). En muchos casos, estas resultan inadecuadas ya que se ha observado

baja eficacia, resistencia, toxicidad, dificultades para su administración y alto costo (4, 5).

Los tratamientos tópicos para la LC son una importante alternativa porque se trata la lesión de forma localizada, con lo que se evita los efectos tóxicos de los tratamientos de la vía sistémica; además, se facilita su administración y se contribuye a que los esquemas de tratamiento se cumplan y, eventualmente, podrían llegar a ser menos costosos. Entre las terapias localizadas para la LC se encuentran los tratamientos con algunos fármacos, los métodos físicos o la combinación de ambos.

Actualmente, los tratamientos localizados de la LC se pueden realizar con fármacos como la paramomicina en forma de ungüentos o cremas (6-9) antimoniales pentavalentes inyectados en la lesión (7, 8) o con métodos físicos utilizando criógenos como el nitrógeno líquido (10), mediante generadores de ondas de radiofrecuencia con temperaturas hasta de 50°C (11) o la terapia fotodinámica (TFD). En esta última, se administra un fotosensibilizador, que al ser activado a una longitud de onda específica, en presencia de oxígeno, puede generar especies reactivas de oxígeno produciendo un efecto citotóxico (12).

La terapia fotodinámica constituye una promisoriosa alternativa para el tratamiento localizado de las lesiones de LC (4, 13-19).

Se ha reportado la efectividad de la TFD contra *L. (L.) amazonensis* *in vitro* e *in vivo* contra *L. major* y contra *L. (V.) braziliensis* (10, 13, 15-17, 20).

La ftalocianina de aluminio clorada (PcAlCl) es un fotosensibilizador utilizado en TFD que ha mostrado actividad *in vivo* e *in vitro* contra amastigotes y promastigotes de diferentes especies de *Leishmania* (13, 15, 16). Utilizada tópicamente ha mostrado actividad contra *L. (L.) amazonensis* (16).

Dadas las propiedades de barrera de la piel, se requiere de sistemas adecuados para hacer que un compuesto aplicado tópicamente pueda atravesar la barrera del estrato córneo y retenerse en el sitio donde va a ejercer su efecto terapéutico. La nanotecnología brinda la posibilidad de obtener sistemas biocompatibles a escala nanométrica, los cuales pueden transportar y entregar un principio activo al blanco terapéutico. Estos sistemas de liberación de fármacos juegan un papel muy importante en la TFD contra leishmaniasis. En la actualidad, se estudian el uso de liposomas, nanopartículas, nanoemulsiones, para el transporte de fotosensibilizadores en formulaciones tópicas (17, 21-23).

Las nanoemulsiones (NE) poseen atractivos biológicos y propiedades farmacéuticas como biodegradabilidad, biocompatibilidad, estabilidad física y facilidad de producción. Han sido utilizadas como vehículos para fármacos lipófilos, para la estabilización de compuestos susceptibles a la hidrólisis y la reducción de la irritación o toxicidad del fármaco (24).

En este trabajo se llevaron a cabo ensayos de permeación transdérmica *in vitro*, los cuales están encaminados a valorar la penetración de un compuesto aplicado en la piel (22, 25, 26) y establecer los cambios en la concentración del fármaco que se encuentra difundiendo a través

de las capas de la piel en función del tiempo. La permeación a través del estrato córneo (EC) es la etapa limitante de velocidad para la absorción percutánea (27), la cual depende de factores específicos, como el peso molecular del compuesto y la formulación o vehículo en el que el compuesto esté incorporado. La formulación de PcAlCl para ser utilizada en humanos con LC, debe hacer que el compuesto penetre la piel humana y se retenga en la dermis, que es el lugar donde se alojan los macrófagos parasitados (28, 29).

Por lo anterior, el objetivo de este trabajo fue determinar la difusión y retención de la PcAlCl en piel humana sana, aplicada en NE o en solución, para su optimización en una formulación tópica como tratamiento de la LC.

Materiales y métodos

Reactivos y equipos:

La ftalocianina de aluminio clorada (PcAlCl), el Tween 20 y el Tween 80 fueron obtenidos de Sigma Aldrich® (St. Louis, MO, Estados Unidos). Se utilizaron además: dimetilsulfóxido (DMSO) de Carlo Erba Reagenti, Rodano, Italia; glicerol de Mallinckrodt, México; cloroformo de Merck, Darmstadt, Alemania; phospholipon 90G (PL90) de Phospholipid, Alemania; ácido oleico de Panreac, Barcelona; sodio dodecil sulfato (SDS) de J.T. Baker®; y etanol al 70% de Laboratorios Productos OSA, Estados Unidos. La cinta adhesiva se obtuvo de Scotch 310 Magic Tape de 3M®. Las celdas de difusión de Franz de Permeagear®, el baño re-circulante de Lauda Brinkmann Ecoline RE 106, y el espectrofluorómetro de Perkin Elmer L55, los tres de Estados Unidos.

Formulaciones de PcAlCl: preparación y caracterización

La nanoemulsión (nano-PcAlCl) se preparó utilizando técnicas de ultrasonificación. Brevemente, se disolvió la fase oleosa (fosfatidilcolina, cloroformo

y ácido oleico) con la fase acuosa (agua tipo I, glicerol y Tween 20) hasta su emulsificación espontánea. Se preparó una segunda formulación de PcAlCl (solución-PcAlCl) compuesta por dimetilsulfóxido, Tween 80 y de agua tipo I, según protocolo de Kyriazi 2007 (30). Como controles se prepararon formulaciones sin PcAlCl. Las soluciones preparadas se mantuvieron en refrigeración y protegidas de la luz. La concentración de PcAlCl en las formulaciones se determinó mediante espectrometría de fluorescencia. Se realizaron además los espectros de absorción y de emisión de fluorescencia de la PcAlCl en las formulaciones nano-PcAlCl y solución-PcAlCl, utilizando como solventes etanol, DMSO y buffer fosfato salino (PBS) pH 7,4 en SDS 2% (PBS-SDS 2%). El tamaño promedio de partícula y el índice de polidispersión (PDI) de cada formulación se determinaron mediante dispersión de luz dinámica (DLS), el potencial Z se determinó por la movilidad electroforética. Las muestras fueron diluidas en PBS pH 7,2 y en agua Tipo I. En la determinación de estos tres parámetros se utilizó un Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd. Malvern, Worcestershire, Reino Unido). Estos parámetros se determinaron a los días 5, 6, 12, 22 después de preparadas para determinar la estabilidad de las mismas.

Obtención de piel humana

Consideraciones éticas y criterios de inclusión: Para la obtención de piel humana se contó con la aprobación del Comité de Ética para la Investigación Científica de la Universidad Industrial de Santander (UIS), con el código CB 12012. Las pacientes firmaron de manera voluntaria el consentimiento informado; se obtuvieron segmentos de piel abdominal de pacientes sanos de género femenino, entre 25 y 45 años de edad, sin antecedentes de enfermedades dermatológicas y que se sometieron a cirugía estética o de corrección de eventraciones.

Obtención y procesamiento de la piel

La piel fue lavada con suero fisiológico y el tejido graso subcutáneo fue removido con el uso de un equipo de disección. La piel se estiró, se envolvió en parafilm y se almacenó a -20°C hasta por tres meses (27).

Ensayos de permeación y retención en piel humana

Fueron realizados en celdas de difusión de Franz según lo descrito por Primo y colegas utilizando piel humana como membrana (22). Se adicionaron 0,3 mL de cada una de las formulaciones en la cámara donadora y se utilizó PBS-SDS 2% como medio receptor. Los experimentos se llevaron a cabo durante doce horas, realizando muestreos a la hora cero, cuatro, ocho, diez y doce. La concentración de PcAlCl se determinó por fluorometría. Se realizaron seis experimentos con la nano-PcAlCl y cuatro experimentos con la solución-PcAlCl, con un tiempo final de doce horas. En cada experimento fueron utilizadas seis celdas.

Para determinar la retención de la PcAlCl en el estrato córneo, la piel utilizada como membrana en cada una de las celdas fue retirada y lavada con suero fisiológico y la concentración de PcAlCl retenida se determinó por el método de la cinta adhesiva (en inglés *tape stripping*). Trozos de cinta pegante (15 cintas) fueron pegados a la parte central de la piel que estuvo en contacto con la celda, haciendo presión y por 30 segundos. La PcAlCl de cada cinta se extrajo con etanol. La retención en epidermis más dermis (E+D) se determinó con el tejido de piel restante, el cual se cortó en pequeños trozos, se maceró y se adicionó en el solvente extractor por 12 horas. La PcAlCl retenida en EC y E+D se determinó por fluorometría, los resultados fueron expresados como concentración de PcAlCl en EC y en E+D, en nM/cm^2 .

El análisis estadístico se realizó mediante el software SPSS versión 19.0, utilizando como

herramientas estadísticas las pruebas no paramétricas de Kruskal Wallis y de Mann Whitney. Se comparó la retención de PcAlCl en las capas de la piel, con las formulaciones utilizadas.

Estudio histopatológico de la piel

Los fragmentos de piel antes y después de los experimentos fueron conservados en formol bufferado (formalina 10%, formaldehído 40%, agua destilada, fosfato de sodio monobásico, fosfato de sodio di-básico). Se realizaron cortes de piel los cuales fueron coloreados con hematoxilina-eosina (H-E), los resultados se muestran en imágenes.

Resultados

Caracterización y estabilidad de las formulaciones

Al realizar estudios de espectrofluorometría a una longitud de onda de emisión de 686 nm y excitación de 670 nm, con cada una de las formulaciones en diferentes tiempos después de su preparación, se encontró que las concentraciones de PcAlCl obtenidas no presentaron modificaciones. Igualmente, al extrapolar estas intensidades en la

curva de calibración en DMSO, se observó que la concentración de PcAlCl en las formulaciones mantuvo valores muy próximos al inicial. Esto demostró que la nano-PcAlCl y la solución-PcAlCl que se utilizaron en este trabajo, mantuvieron una concentración de PcAlCl estable, comparando la concentración obtenida el día de su preparación. Las concentraciones utilizadas de PcAlCl en la nanoemulsión fueron de 168,02 μ M y en la solución fue de 109,21 μ M. Las intensidades y la concentración del compuesto los días 1, 3, 5, 10, 14, 20, después de preparadas, se muestran en la tabla 1.

El espectro de absorción de la PcAlCl en la nano-PcAlCl y en la solución-PcAlCl, diluidas en los diferentes solventes, mostró picos máximos de absorción a 680 nm, (figura 1). Cuando se utilizaron como solventes, el etanol y el DMSO se mantuvieron sus bandas características Soret de 300 a 380 nm y su banda Q de 600 a 700 nm. Cuando se utilizó como solvente el PBS-SDS 2%, se mantuvo la banda Soret, pero la banda Q, no se evidenció de forma característica.

El espectro de emisión de fluorescencia realizado a la PcAlCl en las formulaciones en los diferentes solventes (figura 2), mostró su máxi-

Tabla 1. Concentración de PcAlCl en las formulaciones

Formulación	Día	Intensidad	Concentración (μ M)
Solución-PcAlCl	1	270,46	109,21
	3	263,35	103,32
	5	272,81	113,93
	10	266,94	107,49
	14	259,01	101,50
	20	269,31	109,01
Nano-PcAlCl	1	290,93	168,02
	3	294,65	169,24
	5	288,97	161,02
	10	289,71	155,14
	14	292,87	167,07
	20	288,15	156,93

Nota: Se muestran las intensidades y concentraciones obtenidas al analizar la solución y la nano-PcAlCl por fluorometría (longitud de onda de excitación 670 nm, emisión 686 nm).

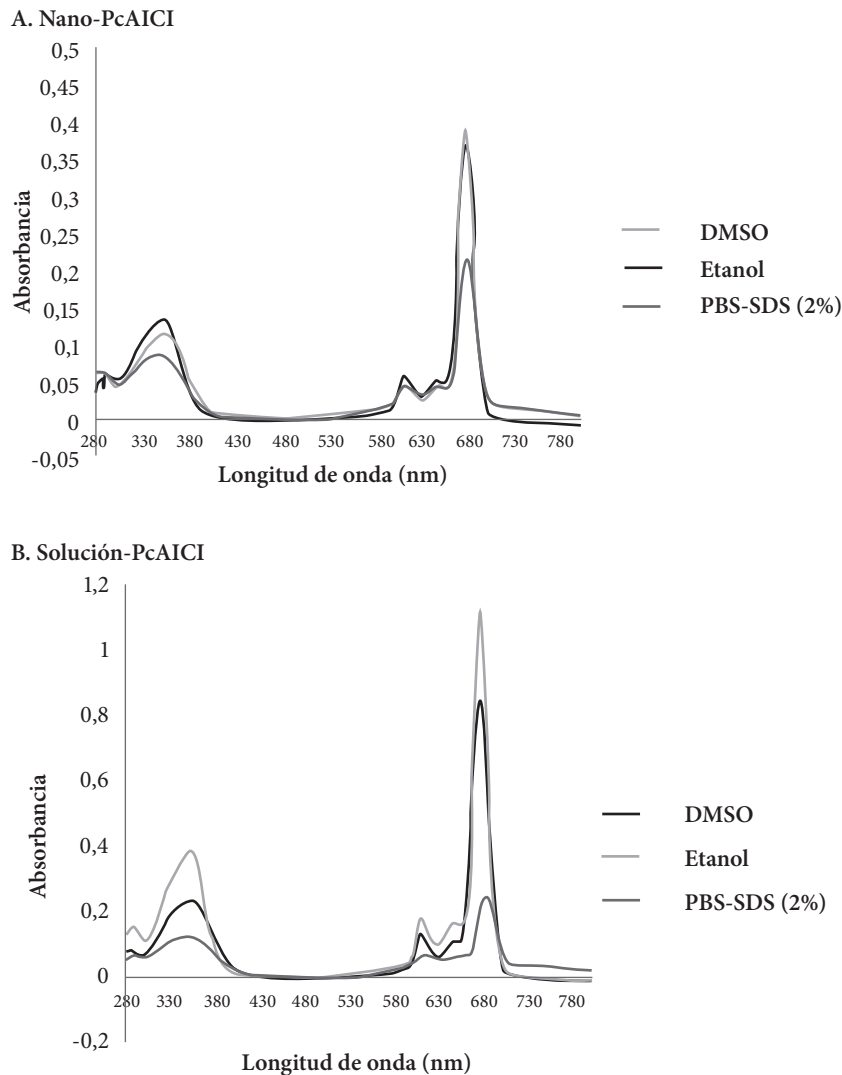


Figura 1. Espectro de absorción de PcAlCl en nano-PcAlCl (A) y solución-PcAlCl (B)

ma emisión de fluorescencia a una longitud de onda de 680 nm, para el DMSO y para el etanol. El espectro de emisión de las formulaciones en PBS 7,4-SDS 2 %, mostró dos picos, presentando su máxima emisión a 730 nm.

A nivel macroscópico, no se evidenció precipitación de los componentes de las formulaciones, ni formación de sobrenadantes, así como tampoco se observó separación de las fases de la nano-PcAlCl. El tamaño promedio de la nano-PcAlCl diluida en agua fue de 132,9 nm, el potencial Z -19,23 y

PDI 0,14, y en PBS pH 7,4 fue de 125,33 nm, el potencial Z -13,69 y PDI 0,139. Como se muestra en la tabla 2 no se presentaron cambios importantes en los parámetros fisicoquímicos de la nano-PcAlCl diluida con PbS pH 7,4 o con agua Tipo I después de preparada.

Permeación de la PcAlCl a través de la piel

No se demostró la presencia de PcAlCl en el medio receptor en ninguno de los tiempos evaluados; el resultado fue el mismo tanto para nano-PcAlCl

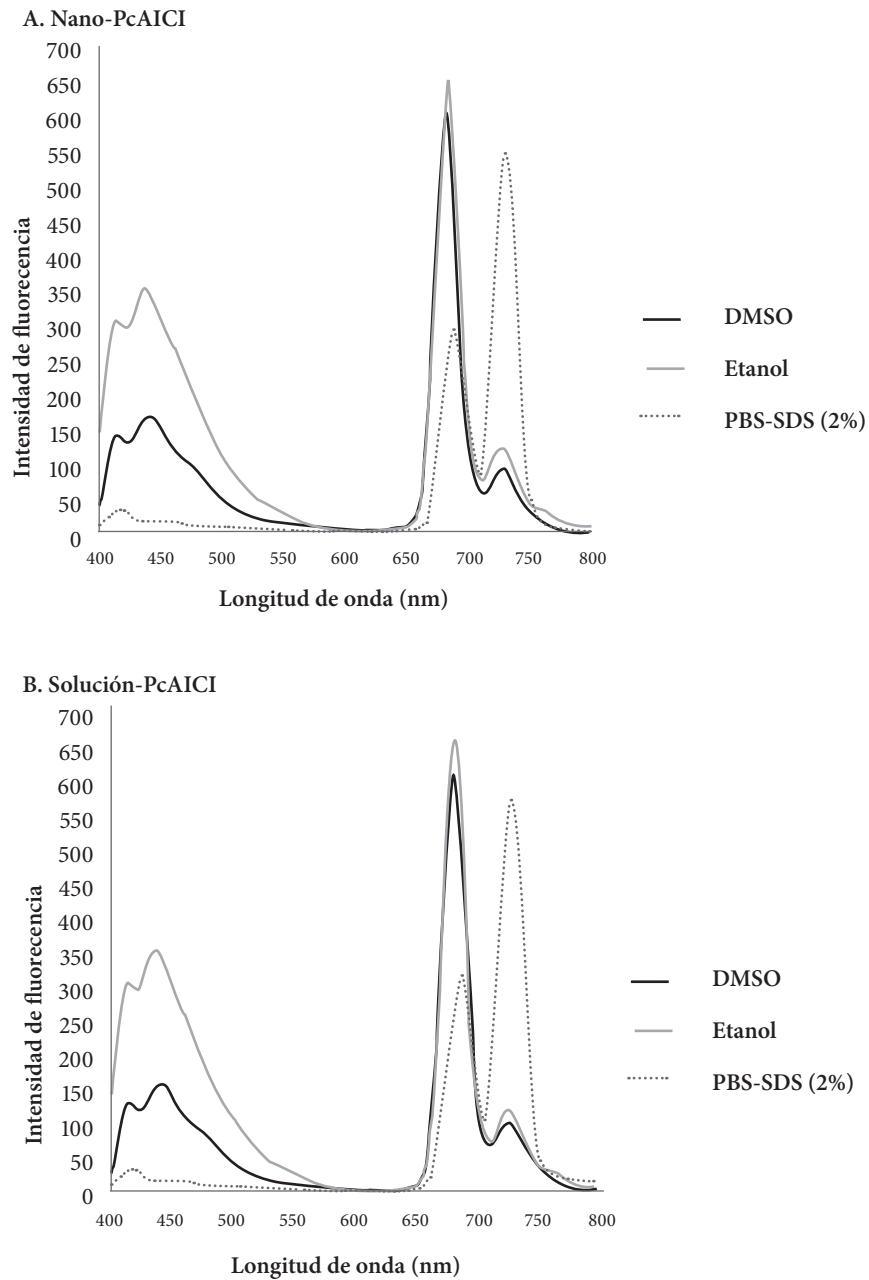


Figura 2. Espectro de emisión de la PcAICI en nano-PcAICI (A) y solución-PcAICI (B)

Tabla 2. Caracterización fisicoquímica de la nano-PcAlCl.

Parámetro medido	Días después de preparación							
	5		6		12		22	
	Agua	PBS*	Agua	PBS	Agua	PBS	Agua	PBS
Tamaño promedio (d,nm)	133,7	119,2	132,2	115,4	132,6	118,4	133,1	118,2
PDI*	0,129	0,151	0,122	0,146	0,14	0,119	0,164	0,141
Potencial Z (mV)	-17,9	-6,79	-19,3	-8,42	-18,3	-8,87	-21,4	-8,52

PBS: buffer fosfato salino pH 7,4; PDI: índice de polidispersión. Los resultados corresponden a las mediciones realizadas 5, 6, 12 y 22 días después de preparación.

como para la solución-PcAlCl, lo que indica que en ninguna de estas formulaciones la PcAlCl pudo atravesar completamente la piel. Los controles realizados con los vehículos (formulación sin PcAlCl) mostraron los mismos resultados.

Retención de la PcAlCl en las capas de la piel
Dado el resultado anterior, donde se demostró que la PcAlCl no pudo permear al medio receptor, se realizaron experimentos para establecer en qué capa de la piel fue retenida la PcAlCl. El ensayo de retención demostraría si la PcAlCl se retuvo en el EC o si pudo llegar hasta capas más profundas de piel: la epidermis o a la dermis.

El tratamiento con la nano-PcAlCl evidenció retenciones promedio de PcAlCl en EC de 44,17 nM y en E+D de 8,48 nM.

El tratamiento con la solución-PcAlCl mostró en el EC retenciones de PcAlCl promedio de 96,99 nM y en E+D la concentración detectada fue en promedio 9,82 nM.

La figura 3 muestra la retención promedio en las capas de la piel, con las formulaciones utilizadas.

El tratamiento con los vehículos no evidenció la presencia de PcAlCl retenida en las capas de la piel, dado que estos no contenían PcAlCl.

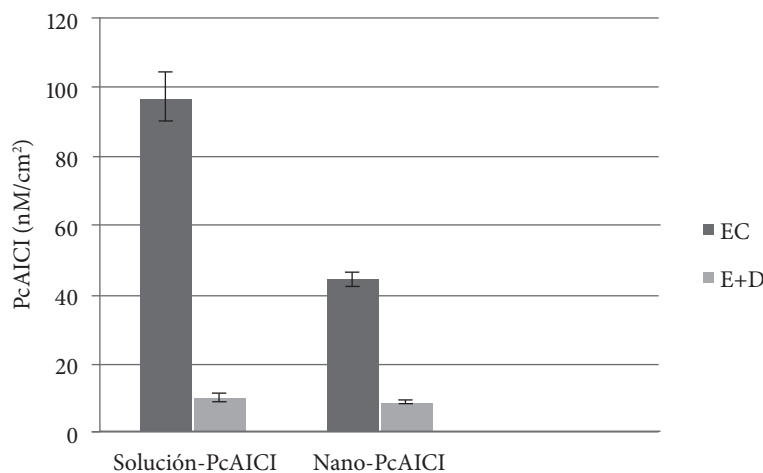


Figura 3. Retención de PcAlCl en piel humana, aplicada como nano-PcAlCl y como solución-PcAlCl. Se presenta la retención de PcAlCl en el estrato córneo (EC) y en epidermis + dermis (E+D) después de doce horas de tratamiento con cada formulación. Los resultados se expresan en nM /cm²

Se encontraron diferencias significativas entre la retención de PcAlCl en EC y en E+D y entre las formulaciones nano-PcAlCl y solución-PcAlCl ($p < 0,05$). Al realizar las comparaciones múltiples de formulaciones y capas de piel, mediante la prueba de Mann-Whitney se encontraron diferencias significativas en los resultados obtenidos cuando se aplicaron las formulaciones nano-PcAlCl y solución-PcAlCl, con valores de $p = 0,0013$. La formulación que más se retuvo en el EC fue la solución-PcAlCl

y ambas formulaciones se retuvieron de forma similar en E+D.

Características de las membranas antes y después de los ensayos

La piel abdominal recién reseca y hasta tres meses después de su congelación a -20°C , evidenció un patrón histológico normal, mostrando condiciones adecuadas para ser utilizada como membrana en los ensayos con celdas de Franz (figura 4).

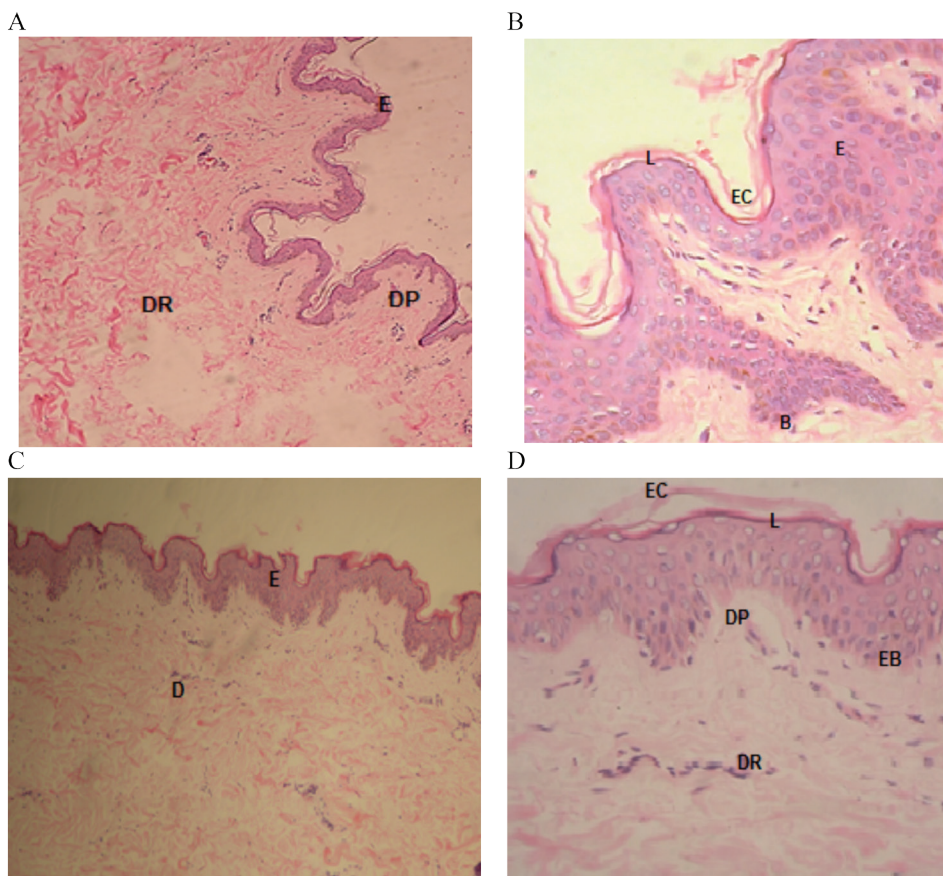


Figura 4. Microfotografías de biopsias de piel obtenida para ensayos de permeación y retención (A y B). Piel abdominal recién reseca, aumento 10x y 40x respectivamente (C y D). Piel abdominal luego de tres meses de congelación, aumento 10x y 40x respectivamente. Coloración Hematoxilina Eosina

E: Epidermis; D: Dermis, DP: Dermis papilar, DR: Dermis reticular, EC: Estrato córneo, L: Estrato lúcido, EB: Estrato basal.

Luego de los experimentos, los fragmentos de piel utilizados como membrana mostraron desprendimiento parcial a total del EC y leve a

moderada fragmentación de colágeno, que se presenta como la disminución en la captación del colorante (figura 5).

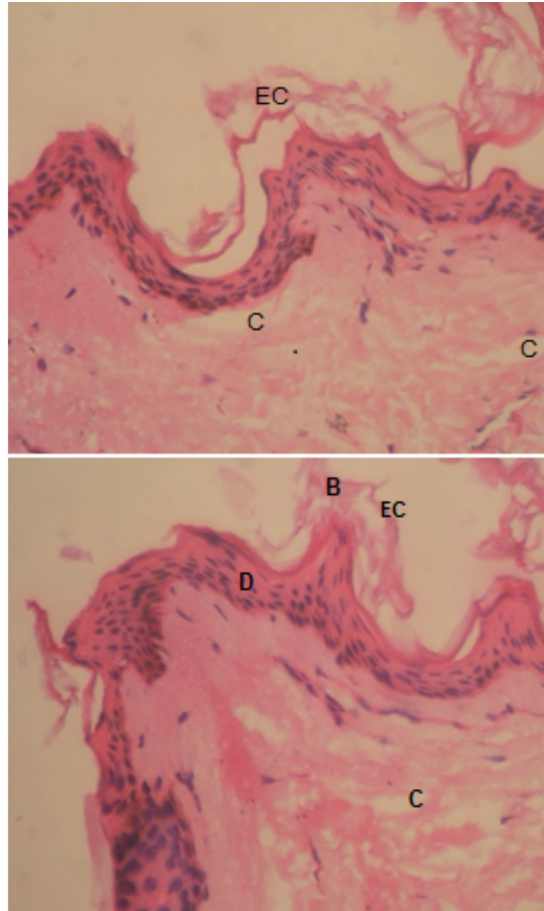


Figura 5. Microfotografías de la piel utilizada como membrana, luego de un ensayo de permeación de doce horas. Coloración hematoxilina eosina. Aumento 10X

B: EC desprendido, C: colágeno fragmentado, D: cambios en el epitelio estratificado, EC: estrato córneo.

Discusión

En este trabajo se evaluaron dos diferentes formulaciones de PcAlCl₃, las cuales permitieron mantener la estabilidad del compuesto durante varios meses y la retención del compuesto en las distintas capas de la piel.

Inicialmente se evaluaron las características fisicoquímicas de las formulaciones y la estabilidad del compuesto. Es conocido que una formulación apta para ser utilizada en TFD debe garantizar que sus componentes (tales como tensoactivos, vehículos, solventes) mantengan

intactas las propiedades fotofísicas del sensibilizador para que este pueda ser estimulado eficientemente con la luz y genere radicales de oxígeno tóxicos para el blanco terapéutico deseado (12, 31, 32). En este trabajo, la concentración de PcAlCl fue estable en el tiempo, los espectros de emisión y absorción de PcAlCl en las formulaciones proporcionaron información importante con respecto al estado agregado o monomérico en el que se encontraban las moléculas de PcAlCl en la nano-PcAlCl y la solución-PcAlCl.

Dado que los diferentes ensayos fueron realizados utilizando diferentes tipos de solvente, se determinó el efecto de estos en el comportamiento de la PcAlCl. Como se esperaba, la PcAlCl presentó un espectro diferente en solventes acuosos. Según Dhimi y Nunes (31, 33), la PcAlCl, como resultado de su esqueleto hidrofóbico, presenta tendencia a la formación de dímeros cuando se encuentra en medios acuosos. En PBS-SDS 2 %, algunas de las moléculas de PcAlCl se muestran en estado asociado, probablemente como dímeros apilados, lo que origina la formación de dos bandas en el espectro de emisión. Espectros realizados de NE de ftalocianina de zinc y ftalocianina de cobre mostraron también la formación de dímeros y agregados de la ftalocianina en medio acuoso, demostrado por la presencia de bandas Q y solet amplias en el espectro de absorción y débil emisión de fluorescencia en el espectro de emisión. Estos agregados al igual que lo demostrado en este trabajo no se formaron cuando la NE se diluye en solventes orgánicos como el DMSO o etanol (33, 34).

Se demostró que la PcAlCl contenida en las diferentes formulaciones no atravesó piel humana sana. Este resultado es de gran importancia pues se espera que la ftalocianina llegue y sea retenida en dermis, la capa de la piel donde se alojan los macrófagos parasitados por *Leish-*

mania (28, 29). Se desea entonces aumentar la penetración del fotosensibilizador a través del EC evitando su absorción sistémica que puede causar una fotosensibilización generalizada del paciente (32). Teóricamente, algunos factores como el bajo contenido de la fase oleosa de la formulación (35) y microcirculación cutánea en el experimento *in vitro* pueden estar involucrados en la no difusión completa del compuesto a la fase receptora (35, 36). La PcAlCl, como compuesto lipofílico y además con un peso molecular alto (574,96 g/mol) y coeficiente de partición octanol agua calculado de 7,3, presenta tendencia a permanecer en el EC en lugar de medios más hidrófilos como la dermis inferior o el mismo medio receptor (37). Para ser utilizada en TFD, se requieren sistemas de liberación de medicamentos que permitan su penetración a la dermis de la piel tales como NE u otras formulaciones que emplean promotores de la permeación transdérmica, como el ácido oleico y Tween 20, DMSO y Tween 80. Ensayos de permeación en piel humana y en otros modelos como piel de cerdo, de rata, entre otros, utilizando NE como sistemas de liberación de fármacos, mostraron permeación de algunos compuestos al medio receptor (38). Una NE de tenoxicam (medicamento antiinflamatorio y contra el dolor) mostró un perfil de liberación del fármaco al medio receptor después de dos horas de iniciado el ensayo (38). Igualmente, una NE de Foscan® (un fotosensibilizador que contiene temoporfirina) pudo penetrar la piel, mostrando un perfil de liberación al medio receptor luego de cuatro horas del ensayo (22).

El tratamiento con las formulaciones de PcAlCl favoreció la retención del compuesto en las capas de la piel. La retención de PcAlCl observada en el EC y en E+D, nos da una idea de cómo fue la interacción entre los componentes de la formulación y el EC. Los fármacos pueden penetrar el EC por diferentes vías (intercelular,

transcelular y apéndices cutáneos), pero considerando las características de lo utilizado en este estudio la ruta probable sería la vía intercelular o vía de los lípidos (39). Los espacios intercelulares del EC consisten en una mezcla de lípidos y la mayoría de los fármacos lipófilos utilizan esta vía (38). La PcAlCl disuelta en la fase oleosa de la NE podría penetrar los lípidos del EC e inestabilizar su estructura de bicapa incrementando así la permeabilidad. Cuando los componentes de la fase acuosa de la nanoemulsión entran en la vía polar, se incrementa el volumen interlamelar de los lípidos del estrato córneo, lo que resulta en una alteración de su estructura al interior de la bicapa; estos componentes, tienen la función de sobrehidratar el estrato córneo lo que contribuye a su permeabilidad (38).

Diversos estudios han demostrado que las NE poseen mejores propiedades para la entrega transdérmica de compuestos comparado con las emulsiones y geles (40-44).

Los potenciadores de la permeación de la nano-PcAlCl (ácido oleico y Tween 20), hicieron que la PcAlCl pudiera penetrar el EC, retenerse allí y pasar a capas más profundas de la piel. Dado que la finalidad de la formulación es que la PcAlCl pudiera llegar hasta la dermis en mayor cantidad, es necesario analizar las razones por las que esta no tuvo mayor retención en la dermis, aquí se podrían considerar algunas condiciones de la formulación como la concentración y proporción de los promotores de la permeación, ya que algunos potenciadores son dependientes de la concentración, por lo tanto es necesario revalorar la concentración óptima para que su funcionamiento como promotor de la permeación sea eficaz. Por otra parte, el tamaño de partícula de las nanoemulsiones y su viscosidad también pudieron afectar a su eficacia; donde el pequeño tamaño de partícula y la baja viscosidad de la nanoemulsión lo con-

vierten en un excelente vehículo para mejorar la absorción percutánea de PcAlCl, haciendo mayor el número de vesículas que pueden interactuar en un área fija de estrato córneo.

En la solución -PcAlCl, fueron utilizados como promotores de la permeación el Tween 80 y el DMSO. Este último es un solvente orgánico que se ha utilizado en bajas concentraciones en otras formulaciones como promotor de la permeación transdérmica e (45); algunos de sus mecanismos de acción se han expuesto en diversas publicaciones, entre estos se encuentran la extracción de lípidos, la denaturación de las proteínas del EC, distorsión del EC como resultado de las altas tensiones osmóticas, todas estas inducidas por el transporte de agua y DMSO dentro del tejido (46). El Tween 80 es un surfactante no iónico, considerado no tóxico y no irritante, que promueve la permeación cutánea, ha sido aprobado como un excipiente farmacéutico por la Food and Drug Administration (FDA).

Estos promotores de la permeación hicieron que la PcAlCl pudiera penetrar el EC, retenerse allí y pasar a capas más profundas de la piel. Dado que esta se retuvo principalmente en el EC, es necesario considerar la concentración y la proporción de estos promotores, debido a que, como se mencionó anteriormente, estos son dependientes de la concentración, lo cual incide en su eficacia como promotor de la permeación.

Dado que en este trabajo se utilizó piel humana como membrana, fue importante determinar las características de la piel tanto en su preservación como en su integridad durante el tiempo de los experimentos. Los fragmentos de piel presentaron las características histológicas propias de la piel abdominal normales antes y tres meses después de su conservación. Según la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico, las propiedades de permeabilidad de la piel se mantienen luego de la resección debido a que quien confiere esta permeabilidad

es el EC compuesto por células muertas (47). Por otro lado, la guía de la organización mundial de la salud EHC 235 (27) acepta que una piel, una vez desprovista del tejido adiposo, se puede conservar a -20°C en bolsas de aluminio.

Los cambios histológicos observados después de los experimentos correspondieron a alteraciones causadas por factores fisiológicos y mecánicos originados como resultado del tiempo que pasó la piel ubicada en la celda de Franz. Es de gran importancia considerar que la formulación sería aplicada en piel ulcerada por LC, la cual en la mayoría de los casos, no solo ha perdido el EC, sino que posiblemente se encontrará desprovista de parte de la epidermis o de la misma dermis. En ausencia de EC, cuando la piel está desnuda por una enfermedad o incluso después de repetidos *tappe stripping*, la absorción de los fármacos en la piel se incrementa (44).

Conocidos estos resultados, sería conveniente que se realizaran futuros ensayos *in vitro* con piel humana desprovista de EC, evaluando la penetración en tiempos más cortos, lo que evitaría el deterioro de la piel. Además, la realización de experimentos *in vivo* con animales infectados con LC, permitiría establecer las interacciones de las formulaciones con la piel ulcerada en un sistema vivo, lo que contribuiría a mejorar las formulaciones y avanzar en

el proceso de optimización de formulaciones tópicas para el tratamiento de la LC.

Agradecimientos

Se agradece a los doctores Víctor Martínez, Javier Higuera y Carlos Díaz, por su apoyo en la consecución de los fragmentos de piel. También a la doctora Sandra Milena Leal por el apoyo en la preparación de las formulaciones.

Descargos de responsabilidad

Los autores del presente trabajo asumimos la responsabilidad por los resultados presentados en el artículo. Este trabajo de investigación contó con la aprobación del Comité de Ética para la Investigación Científica de la UIS, con el código CB 12012. Es un artículo original, que los autores han leído y están de acuerdo con su contenido, que este no ha sido publicado con anterioridad, que no se ha solicitado su publicación en otra revista. El presente trabajo fue financiado por el Instituto Colombiano para el Desarrollo de la Ciencia y la Tecnología Francisco José de Caldas Colciencias, contrato 110251929044 y la Universidad Industrial de Santander.

Conflicto de interés

Los autores declaramos que no se presentó conflicto de interés en la realización de este trabajo.

Bibliografía

1. OMS. Resolución EB 118/4, Control de leishmaniasis (2006 may 30).
2. Instituto Nacional de Salud. Protocolo de Vigilancia y Control de la leishmaniasis. PRO-R02.0000-016 [internet] 2012 [citado 2012 Nov. 8]. Disponible en: <http://www.ins.gov.co/lineas-de-accion/Subdireccion-Vigilancia/sivigila/Protocolos%20SIVIGILA/LEISHMANIASIS.pdf>
3. Soto J, Soto P. Estado actual y futuro de la terapia anti-leishmaniásica en Colombia. *Biomédica*. 2006;26(1):194-206.
4. Ameen M. Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis: emerging therapies and progress in disease management. *Expert Opin Pharmacother*. 2010;11(4):557-69.
5. Croft SL, Seifert K, Yardley V. Current scenario of drug development for leishmaniasis. *Indian J Med Res*. 2006;123(3):399-410.

6. Neva FA, Ponce C, Ponce E, Kreutzer R, Modaber F, Olliaro P. Non-ulcerative cutaneous leishmaniasis in Honduras fails to respond to topical paramomycin. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1997;91(4):473-5.
7. Blum J, Desjeux P, Schwartz E, Beck B, Hatz, C. Treatment of cutaneous leishmaniasis among travellers. *J Antimicrob Chemother.* 2004;53(2):158-66.
8. Minodier P, Parola P. Cutaneous leishmaniasis treatment. *Travel Med Infect Dis.* 2007;5(3):150-8.
9. Lecoer H, Buffet PA, Milon G, Lang T. Early curative applications of the aminoglycoside WR279396 on an experimental *Leishmania major*-loaded cutaneous site do not impair the acquisition of immunity. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010;54(3):984-90.
10. Asilian A, Sadeghinia A, Faghihi G, Momeini A, Amini A. The efficacy of treatment with intralesional meglumine antimoniate alone, compared with that of cryotherapy combined with the meglumine antimoniate or intralesional sodium stibogluconate, in the treatment of cutaneous leishmaniasis. *Ann Trop Med Parasitol.* 2003;97(5):493-8.
11. Navin TR, Arana BA, Arana FE, de Mérida AM, Castillo AL, Pozuelos JL. Placebo-controlled clinical trial of meglumine antimonite (glucantime) vs. localized controlled heat in the treatment of cutaneous leishmaniasis in Guatemala. *Am J Trop Med Hyg.* 1990;42(1):43-50.
12. Hopper C. Photodynamic therapy: a clinical reality in the treatment of cancer. *Lancet Oncol.* 2000;1(4):1212-9.
13. Dutta S, Ray D, Kolli BK, Chang KP. Photodynamic sensitization of *Leishmania amazonensis* in both extracellular and intracellular stages with aluminium phthalocyanine chloride for photolysis in vitro. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005;49(11):4474-84.
14. Akilov OE, O'Riordan K, Kosaka S, Hasan T. Photodynamic therapy against intracellular pathogens: Problems and potentials. *Med Laser Applic.* 2006;21(4):251-60.
15. Escobar P, Hernández IP, Rueda CM, Martínez F, Páez E. Photodynamic activity of aluminium (III) and zinc (II) phthalocyanines in *Leishmania* promastigotes. *Biomedica.* 2006;26(1):49-56.
16. Hernández IP. Actividad fototóxica in vivo e in vitro de la ftalocianina de aluminio clorada contra *Leishmania amazonensis*. [Tesis de maestría]. [Bucaramanga]: Universidad Industrial de Santander; 2010. 110 p.
17. Montanari J, Maidana C, Esteva MI, Salomon C, Morilla MJ, Romero EL. Sunlight triggered photodynamic ultradeformable liposomes against *Leishmania braziliensis* are also leishmanicidal in the dark. *J Control Release.* 2010;147(3):368-76.
18. Peloi LS, Biondo CE, Kimura E, Politi MJ, Lonardon MV, Aristides SM, et al. Photodynamic therapy for American cutaneous leishmaniasis: the efficacy of methylene blue in hamsters experimentally infected with *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. *Exp Parasitol.* 2011;128(4):353-6.
19. Taylor VM, Cedeño DL, Muñoz DL, Jones MA, Lash TD, Young AM, et al. In vitro and in vivo studies of the utility of dimethyl and diethyl carbaporphyrin ketals in treatment of cutaneous leishmaniasis. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011;55(10):4755-64.
20. Valdivieso W, Hernández IP, Martínez F, Páez E, Escobar P. Efecto fototóxico de la terapia fotodinámica en promastigotes de *Leishmania amazonensis*. *Salud UIS.* 2008;40(1):13-9.
21. Vargas A, Eid M, Fanchaouy M, Gurny R, Delie F. In vivo photodynamic activity of photosensitizer-loaded nanoparticles: formulation properties, administration parameters and biological issues involved in PDT outcome. *Eur J Pharm Biopharm.* 2008;69(1):43-53.
22. Primo FL, Rodrigues MA, Simioni AR, Bentley MV, Morais PC, Tedesco AC. In vitro studies of cutaneous retention of magnetic nanoemulsion loaded with zinc phthalocyanine for synergic use in skin cancer treatment. *J Magn Magn Mater.* 2008;320(14):211-4.

23. Takegami S, Kitamura K, Kawada H, Matsumoto Y, Yoshimura S, Kitade T. Distribution of chloroaluminum phthalocyanine in a lipid emulsion as studied by second-derivate spectrophotometry. *Micro and Nanosystems*. 2010;2(6):280-5.
24. González JM, López M, Ruiz G. Informe de vigilancia tecnológica: Nanomedicina. Madrid: CIBT, CEIM, Comunidad de Madrid; 2006.
25. Kreilgaard, M. Dermal pharmacokinetics of microemulsion formulations determined by in vitro microdialysis. *Pharm Res*. 2001;18(3):367-73
26. Santoyo S, Ga de Jalón E, Ygartua P, Renedo MJ, Blanco-Prieto MJ. Optimization of topical cidofovir penetration using microparticles. *Int J Pharm*. 2002;242(1-2):107-13.
27. World Health Organization (WHO). Environmental health criteria 235. Dermal absorption. Geneva: WHO; 2006.
28. Garnier T, Mäntilä A, Järvinen T, Laurence MJ, Brown MB, Croft SL. Topical buparvaquone formulations for the treatment of cutaneous leishmaniasis. *J Pharm Pharmacol*. 2007; 59(1):41-9.
29. Reithinger R, Dujardin JC, Louzir H, Pirmez C, Alexander B, Brooker S. Cutaneous leishmaniasis. *Lancet Infect Dis*. 2007;7(9):581-96.
30. Kyriazi M, Alexandratou E, Yova D, Rallis M, Trebst T. Topical photodynamic therapy of murine non-melanoma skin carcinomas with aluminium phthalocyanine chloride and a diode laser: pharmacokinetics, tumor response and cosmetic outcomes. *Photodermatol Photoimmunol Photomed*. 2008;24(2):87-94.
31. Dhami S; Phillips D. Comparison of the photophysics of an aggregating and non-aggregating aluminum phthalocyanine system incorporated into unilamellar vesicles. *J Photochem Photobiol*. 1996;100(1-3):77-84.
32. Rossetti FC, Lopes LB, Carollo AR, Thomazini JA, Tedesco AC, Bentley MV. A delivery system to avoid self-aggregation and to improve in vitro and in vivo skin delivery of a phthalocyanine derivative used in the photodynamic therapy. *J Control Release*. 2011;155(3):400-8.
33. Nunes SM, Sguilla FS, Tedesco AC. Photophysical studies of zinc phthalocyanine and chloroaluminum phthalocyanine incorporated into liposomes in the presence of additives. *Braz. J Med Biol Res*. 2004; 37(2):273-84.
34. Rauf MA, Hisaindee S, Graham JP, Nawaz M. Solvent effects on the absorption and fluorescence spectra of Cu(II)-phthalocyanine and DFT calculations. *J Mol Liq*. 2012;168:102-9.
35. Osborne DW, Ward AJ, O'Neill KJ. Microemulsions as topical drug delivery vehicles: in-vitro transdermal studies a model hydrophilic drug. *J Pharm Pharmacol*. 1991;43(6):450-4.
36. Godin B, Touitou E. Transdermal skin delivery: predictions for humans from in vivo, ex vivo and animal models. *Adv Drug Deliv Rev*. 2007;59(11):1152-61.
37. Valdivieso W. Marcadores de apoptosis en *Leishmania panamensis* inducidos por la terapia fotodinámica con ftalocianina de aluminio clorada como fotosensibilizador. [Tesis de maestría]. [Bucaramanga]: Universidad Industrial de Santander; 2010. 110 p.
38. Abu-Elyzaid SK, Kassem AA, Samy AM, Gomaa ME. Evaluation of skin permeation and pharmacological effects of tenoxicam nanoemulsión in topical formulations. *Asian J Pharm Health Sci*. 2011;1(3):99-105.
39. Trommer H, Neubert RH. Overcoming the stratum corneum: the modulation of skin penetration. A review. *Skin Pharmacol Physiol*. 2006;19(2):106-21.
40. Delgado-Charro MB, Iglesias-Vilas G, Blanco-Mendez J, López-Quintela MA, Marty JP, Guy RH. Delivery of a hydrophilic solute through the skin from novel microemulsion systems. *Eur J Pharm Biopharm*. 1997;43(1):37-42.

41. Lee PJ, Langer R, Shastri P. Novel microemulsion enhancer formulation for simultaneous transdermal delivery of hydrophilic and hydrophobic drugs. *Pharm Res.* 2003;20(2):264-9.
42. Kreilgaard M. Dermal pharmacokinetics of microemulsion formulations determined by in vitro microdialysis, *Pharm Res.* 2001;18(3):367-73.
43. Gasco MR, Gallarate M, Pattarino F. In-vitro permeation of zelaic acid from viscosized microemulsions. *Int J Pharm.* 1991;69:193-6.
44. Kriwet K, Muller-Goymann CC. Diclofenac release from phospholipids drug systems and permeation through excised human stratum corneum. *Int J Pharm.* 1995;125(2):231-42
45. El-On J, Jacobs GP, Witztum E, Greenblatt CL. Development of topical treatment for cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania major* in experimental animals. *Antimicrob Agents Chemother.* 1984;26(5):745-51.
46. Anigbogu AN, Williams AC, Barry BW, Edwards HG. Fourier transform Raman spectroscopy of interactions between the penetration enhancer dimethylsulfoxide and human stratum corneum. *Int J Pharm.* 1995;125:265-82.
47. OECD. Guidance Document for the Conduct of Skin Absorption Studies. París: OECD Publishing; 2004.