



**UNIVERSIDAD
DE GRANADA**

**Estudio galénico de nuevas
formulaciones tópicas para el
tratamiento y control de
infecciones fúngicas mucocutáneas**

«Galenic study of new topical formulations for the treatment
and control of mucocutaneous fungal infections»

Tesis doctoral

Programa de Doctorado de Farmacia

Noelia Pérez González

2025

El presente trabajo titulado **“ESTUDIO GALÉNICO DE NUEVAS FORMULACIONES TÓPICAS PARA EL TRATAMIENTO Y CONTROL DE INFECCIONES FÚNGICAS MUCOCUTÁNEAS”**, se ha desarrollado en los laboratorios del Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Granada



**UNIVERSIDAD
DE GRANADA**

Facultad de Farmacia

Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica



**UNIVERSIDAD
DE GRANADA**

Facultad de Farmacia

Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica

Programa de doctorado en Farmacia

Estudio galénico de nuevas formulaciones tópicas para el tratamiento y control de infecciones fúngicas mucocutáneas

«Galenic study of new topicals formulations for the treatment and control of
mucocutaneous fungal infections»

Memoria de Tesis presentada por Noelia Pérez González para optar al título de Doctor por la Universidad de Granada.

Esta Tesis doctoral ha sido dirigida por las Doctoras Beatriz Clares Naveros, profesora titular del Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica, y por la Doctora María José Martín Villena, Farmacéutica Titular del Estado (Ministerio de Sanidad).

Directoras de Tesis

Dra. Beatriz Clares Naveros

Dra. María José Martín Villena

Doctoranda

Noelia Pérez González

Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales
Autor: Noelia Pérez González
ISBN: 978-84-1195-950-6
URI: <https://hdl.handle.net/10481/108886>

Además de las publicaciones, parte de los resultados derivados de esta Tesis Doctoral han sido presentados en los siguientes congresos:

· **IN2UB 2021 Meeting (Barcelona, España) – Pósteres:**

- **Noelia Pérez González, José A. Morales Molina, Mireia Mallandrich, Lyda Halbaut Bellowa, María J. Rodríguez Lagunas, Beatriz Clares Naveros, Ana C. Calpena Campmany.**
Development and characterization of a thermosensitive poloxamer-chitosan hydrogel for the treatment of vulvovaginal candidiasis.
- **Noelia Pérez González, José A. Morales Molina, Elisa Giannone, Lyda Halbaut Bellowa, María J. Rodríguez Lagunas, Beatriz Clares Naveros, Ana C. Calpena Campmany.**
Novel antifungal drug and new formulation for the treatment of oral candidiasis.
- **Noelia Pérez González, José A. Morales Molina, Nuria Bozal de Febrer, Tingting Huang, Beatriz Clares Naveros, Ana C. Calpena Campmany.**
New antifungal formulation for the treatment of dermatomycosis: design and evaluation.
- **Noelia Pérez González, José A. Morales Molina, Roya Mohammadi Meyabadi, María J. Montes López, Beatriz Clares Naveros, Ana C. Calpena Campmany.**
Development and characterization of new antifungal formulations to combat ocular keratitis.

· **I Foro "Generación de Igualdad en Investigación" (Granada, España) – Póster:**

- **Noelia Pérez González, María J. Martín Villena, José A. Morales Molina, Beatriz Clares Naveros.**
Diseño y optimización de nuevos sistemas de liberación de antifúngicos para el tratamiento de la mucositis oral.

· **Skin Forum 2022 Annual Meeting (Malmö, Suecia) – Póster:**

- **Noelia Pérez González, José L. Soriano Ruiz, María Rincón, Ana C. Calpena Campmany, Nuria Bozal-de-Febrer, Beatriz Clares Naveros.**
A novel hydrogel of poloxamer 407-chitosan-hyaluronic acid as possible wound healing in skin and mucous.

· **III Congreso Nacional – V Jornadas de Investigadores/as en Formación Fomentando la Interdisciplinariedad (JIFFI) (Granada, España) – Comunicación oral:**

- **Noelia Pérez González, Ana C. Calpena Campmany, José A. Morales Molina, José L. Soriano Ruiz, Francisco Fernández Campos, Beatriz Clares Naveros.**
Nuevo tratamiento tópico antifúngico contra la candidiasis vulvovaginal.

· **III Congreso Internacional y VIII Encuentros Hispano Cubanos (Granada, España) – Póster:**

- **Noelia Pérez González, Beatriz Clares Naveros, José Antonio Morales Molina.**
Aplicaciones de biopolímeros como productos sanitarios en afecciones bucales.

"Si tienes pasión por algo, nada te detendrá.
No permitas que nada ni nadie te haga dudar de tus habilidades."

Shirley Ann Jackson

AGRADECIMIENTOS

No sé cuántas veces habré imaginado este momento, pero ahora que ha llegado, es difícil encontrar las palabras exactas para expresar todo lo que siento. Este trabajo no solo refleja el esfuerzo personal invertido, sino también el apoyo constante, la confianza y el cariño de muchas personas que, de una u otra manera, han sido fundamentales en este recorrido.

En primer lugar, quiero agradecer a mis directoras, Bea y María José, por todo el apoyo que me habéis dado a lo largo de todo este proceso. Gracias por confiar en mí, por dedicarme tanto tiempo y por estar siempre dispuestas a resolver mis dudas y orientarme en cada paso. Vuestra paciencia, dedicación y compromiso han sido fundamentales para que este trabajo fuera posible. No solo me habéis guiado en lo académico, sino que me habéis dado fuerza y motivación cuando las cosas se ponían complicadas. Gracias por empujarme a dar lo mejor de mí.

A Ana y Mireia, no tengo palabras suficientes para agradecer todo lo que habéis hecho por mí. Gracias por estar siempre ahí, por vuestra entrega y por hacer que todo funcionara incluso cuando parecía que no íbamos a conseguirlo. Vuestra dedicación ha sido un pilar fundamental en este camino. Cuando llegué a Barcelona, me acogisteis con los brazos abiertos y, de verdad, de vosotras aprendí muchísimo. Al resto del equipo de Barcelona, gracias por ser un apoyo tanto profesional como personal. Por compartir vuestros conocimientos, momentos de risas y estrés, y por hacer que los ratos de trabajo fueran mucho más llevaderos. Cada uno de vosotros ha sumado algo único y ha hecho que esta experiencia fuera aún más gratificante.

A José Antonio, por su ayuda incondicional, sus consejos y su disposición para echar una mano cuando lo he necesitado.

A Teo, Almudena y Ana Leticia, por darme la oportunidad de crecer profesionalmente mientras completaba este desafío personal. Y a mis chicas del desayuno, gracias por estar siempre ahí, por escucharme cuando necesitaba desahogarme, por aguantar mis quejas y, sobre todo, por animarme a seguir cuando más lo necesitaba. Y a ti Ana, aunque sigas resistiéndote a los desayunos, gracias por las risas y por recordarme que, en los momentos difíciles, siempre es mejor tener a alguien cerca... aunque sea del pueblo de al lado.

A Cristina, porque este trabajo podría ser tan mío como suyo. Mi compañera de batallas y una de las personas que más ha creído en mí incluso cuando yo misma dudaba. Gracias por escucharme, por ayudarme, por animarme y por levantarme cuando sentía que no podía más. Tu apoyo ha sido incondicional y no sé qué habría hecho sin ti. No hay suficientes palabras para expresar lo agradecida que estoy por tenerte a mi lado.

A mis amigas, las de siempre y las de ahora, porque la familia no solo es la que te toca, sino también la que eliges. Gracias por vuestra paciencia, por comprender mis ausencias, por celebrarlo todo conmigo y por ser ese refugio en el que siempre encuentro apoyo y risas. Sabéis quiénes sois, y espero que sepáis también lo importantes que sois para mí.

A mi familia, mi pilar más sólido. A mis padres, José y Encarni, que con su amor incondicional han estado ahí en cada momento, apoyándome incluso sin comprender del todo lo que hacía. A mi hermana Anabel, mi compañera de vida, gracias por tu cariño, por estar siempre a mi lado y, sobre todo, por darme a dos sobrinos que, sin ser conscientes, han sido un motor constante de motivación. Gracias por vuestras palabras de ánimo y por ser el hogar al que siempre puedo volver. A mis abuelos, y especialmente a mi abuela, ojalá pudieras estar aquí para ver hasta dónde he llegado. Estoy segura de que, allá donde estés, te sentirías orgullosa de todo lo que he logrado.

A Antonio y Mari, mis segundos padres, por su cariño, por su apoyo y por estar siempre ahí con un consejo, una sonrisa o un abrazo cuando más lo he necesitado.

Y a Samuel, gracias por cruzarte en mi camino e intentar entenderme cuando ni yo misma lo hacía. Tu infinita paciencia y apoyo incondicional han sido mi refugio en los momentos más complicados.

Por último, quiero agradecer también a todas aquellas personas que, de alguna manera, han formado parte de este camino, aunque no estén mencionadas aquí. Cada palabra de ánimo, cada gesto de apoyo y cada conversación me ha ayudado a llegar hasta aquí.

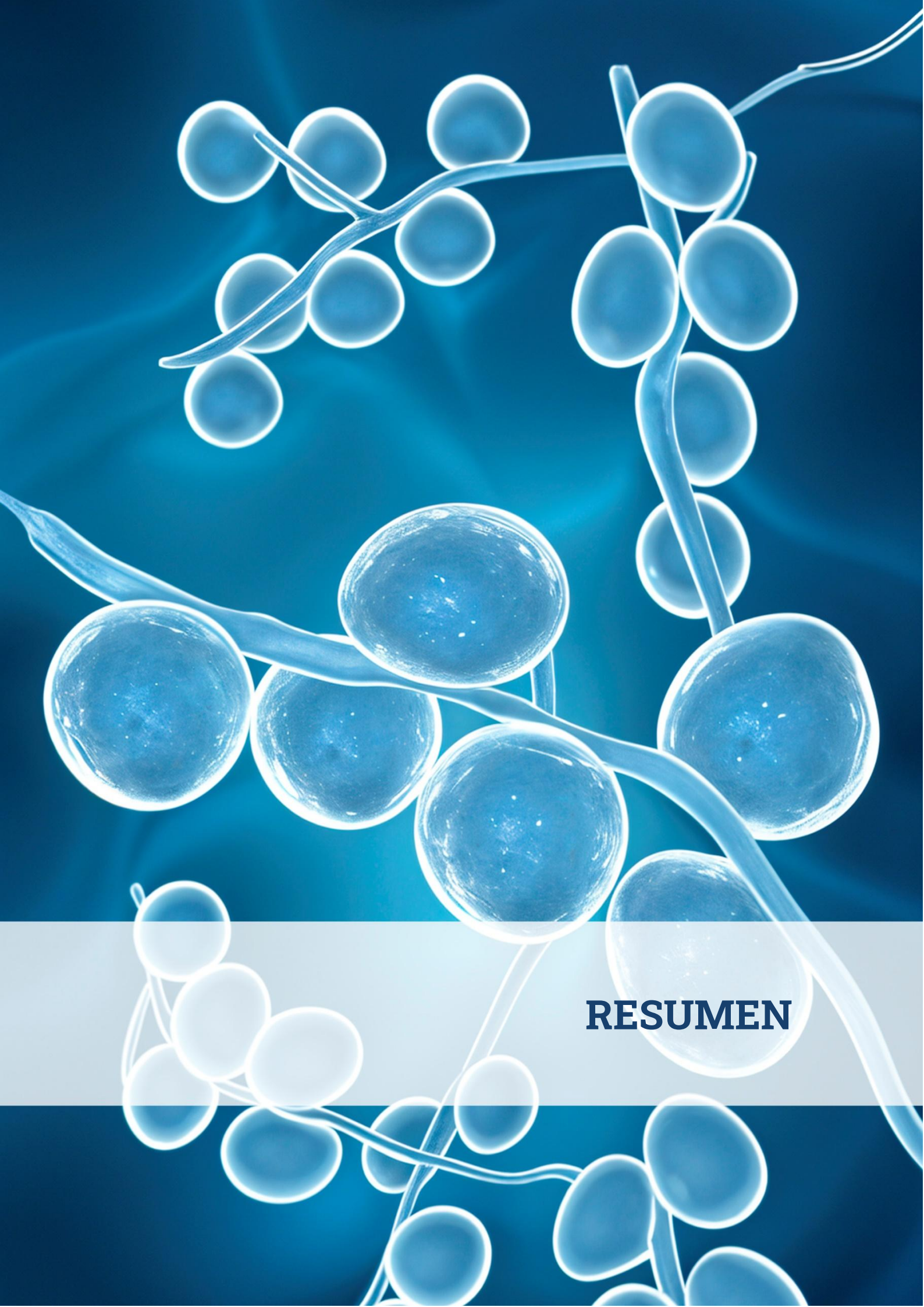
A todos, gracias de corazón.

Índice

RESUMEN	1
ABREVIATURAS Y SIGLAS	5
1. INTRODUCCIÓN	9
<i>1.1. Principales infecciones causadas por hongos.....</i>	<i>11</i>
<i>1.1.1. Infecciones causadas por hongos filamentosos</i>	<i>12</i>
<i>1.1.2. Infecciones causadas por hongos levaduriformes</i>	<i>19</i>
1.2. Candidiasis.....	26
<i>1.2.1. Patogenicidad</i>	<i>27</i>
<i>1.2.2. Candidiasis superficiales</i>	<i>29</i>
1.2.2.1. Queratitis fúngica	30
1.2.2.2. Candidiasis oral.....	31
1.2.2.3. Candidiasis vulvovaginales.....	32
1.2.2.4. Candidiasis cutáneas.....	34
<i>1.2.3. Candidiasis invasivas</i>	<i>35</i>
1.2.3.1. Candidiasis oculares.....	35
1.2.3.2. Otras formas de candidiasis invasiva	36
1.3. Fármacos antifúngicos.....	37
<i>1.3.1. Polienos o macrólidos poliénicos.....</i>	<i>40</i>
<i>1.3.2. Azoles</i>	<i>41</i>
<i>1.3.3. Equinocandinas</i>	<i>44</i>
1.3.3.1. Caspofungina	46
1.3.3.1.1. Propiedades fisicoquímicas	46
1.3.3.1.2. Propiedades farmacológicas	47
1.3.3.1.3. Propiedades farmacocinéticas	47
1.3.3.1.4. Administración y posología	48
1.3.3.1.5. Indicación terapéutica.....	48
1.3.3.1.6. Efectos adversos.....	49
1.3.3.1.7. Formulaciones comerciales de caspofungina	49

1.3.4. Otros fármacos antifúngicos.....	50
1.4. Administración tópica.....	51
1.4.1. Mucosa ocular.....	52
1.4.1.1. Fisiología de la mucosa ocular.....	52
1.4.1.2. Limitaciones de la vía ocular.....	55
1.4.2. Mucosa oral.....	56
1.4.2.1. Fisiología de la mucosa oral.....	56
1.4.2.2. Limitaciones de la vía bucal.....	59
1.4.3. Mucosa vaginal.....	60
1.4.3.1. Fisiología de la mucosa vaginal.....	60
1.4.3.2. Limitaciones de la vía vaginal.....	62
1.4.4. Piel.....	63
1.4.4.1. Fisiología de la piel.....	63
1.4.4.2. Limitaciones de la vía cutánea.....	67
1.4.5. Permeabilidad de las mucosas y la piel.....	67
1.5. Formas farmacéuticas tópicas como vehículos de CSP para el tratamiento farmacológico de infecciones fúngicas mucocutáneas.	68
1.5.1. Colirios.....	70
1.5.2. Enjuagues bucales.....	71
1.5.3. Pasta grasa.....	72
1.5.4. Hidrogeles.....	73
1.5.4.1. Propiedades fisicoquímicas.....	74
1.5.4.2. Clasificación.....	74
1.5.4.3. Polímeros empleados en la formación de hidrogeles.....	76
1.5.4.3.1. Chitosán.....	76
1.5.4.3.2. Poloxamer 407.....	77
2. HIPÓTESIS Y JUSTIFICACIÓN.....	81
3. OBJETIVOS Y PLAN DE ESTUDIO.....	89

4. RESULTADOS	93
<i>Artículo 1.....</i>	<i>95</i>
<i>Artículo 2.....</i>	<i>123</i>
<i>Artículo 3.....</i>	<i>161</i>
<i>Artículo 4.....</i>	<i>187</i>
 5. DISCUSIÓN GENERAL.....	 215
<i>5.1. Formulaciones oculares</i>	<i>217</i>
<i>5.2. Formulaciones bucales</i>	<i>221</i>
<i>5.3. Formulaciones vaginales</i>	<i>228</i>
<i>5.4. Formulaciones tópicas</i>	<i>234</i>
 6. CONCLUSIONES	 243
7. BIBLIOGRAFÍA	249
8. ANEXOS	271
<i>Anexo 1. Material suplementario del artículo 2.....</i>	<i>273</i>

A microscopic image of yeast cells, likely Saccharomyces cerevisiae, showing individual cells and chains of cells. The cells are spherical and have a distinct cell wall. The background is a deep blue with a subtle, wavy texture. A horizontal white band runs across the middle of the image, partially obscuring the cells. The word "RESUMEN" is written in a bold, dark blue, sans-serif font on the right side of the white band.

RESUMEN

En las últimas décadas ha aumentado notablemente la incidencia de infecciones por hongos oportunistas, convirtiéndose en un problema significativo de salud pública. Este incremento se debe principalmente al mayor número de pacientes inmunocomprometidos, aunque también hay otros factores que contribuyen a la aparición de estas infecciones fúngicas. Entre estos factores se incluyen el uso de antibióticos de amplio espectro, hospitalizaciones prolongadas, nutrición parenteral, edad avanzada y diabetes. Las especies de *Candida*, *Aspergillus* y *Cryptococcus* siguen siendo las principales responsables de las micosis en humanos. Entre ellas, *Candida* es la causa más frecuente de candidiasis invasivas y diseminadas, representando entre el 70% y el 90% de los casos. Existen diferentes especies del género *Candida*, siendo *C. albicans* la más prevalente y virulenta, seguida de otras especies importantes como *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. krusei* y *C. parapsilosis*, cada una con características distintivas que influyen en su patogenicidad y resistencia a los tratamientos antifúngicos.

El tratamiento de las micosis se basa en el empleo de fármacos antifúngicos, y aunque la mayoría de los pacientes responden bien al tratamiento, las tasas de mortalidad relacionadas con estas infecciones son preocupantemente altas. Además, existe una creciente inquietud por la resistencia a los agentes antifúngicos. Afortunadamente, el arsenal de medicamentos antifúngicos sigue mejorando constantemente. Estos se dividen en tres grupos principales: los polienos, los azoles y las equinocandinas, al que se le pueden sumar otros fármacos con diferentes acciones antimicóticas, como la 5-fluorocitosina, la griseofulvina y la terbinafina, entre otros. Para abordar estos factores limitantes, podría considerarse el desarrollo de nuevos vehículos terapéuticos tópicos que permitan la administración local de fármacos antifúngicos que hasta ahora solo se han usado a nivel sistémico. Un ejemplo de esto es la caspofungina (CSP). CSP pertenece al grupo de las equinocandinas, conocidas por su novedoso mecanismo de acción: inhiben la síntesis de (1,3)-D-glucano, elemento esencial de la pared celular fúngica. Esto las hace especialmente efectivas contra *Candida* y *Aspergillus*.

El principal objetivo de esta tesis doctoral es el diseño, desarrollo y caracterización de formulaciones tópicas de CSP para el tratamiento de infecciones fúngicas mucocutáneas, con especial énfasis en las causadas por *Candida* spp. Se han desarrollado formulaciones para la administración ocular, bucal, vaginal y cutánea, evaluando tanto los materiales empleados como su efectividad.

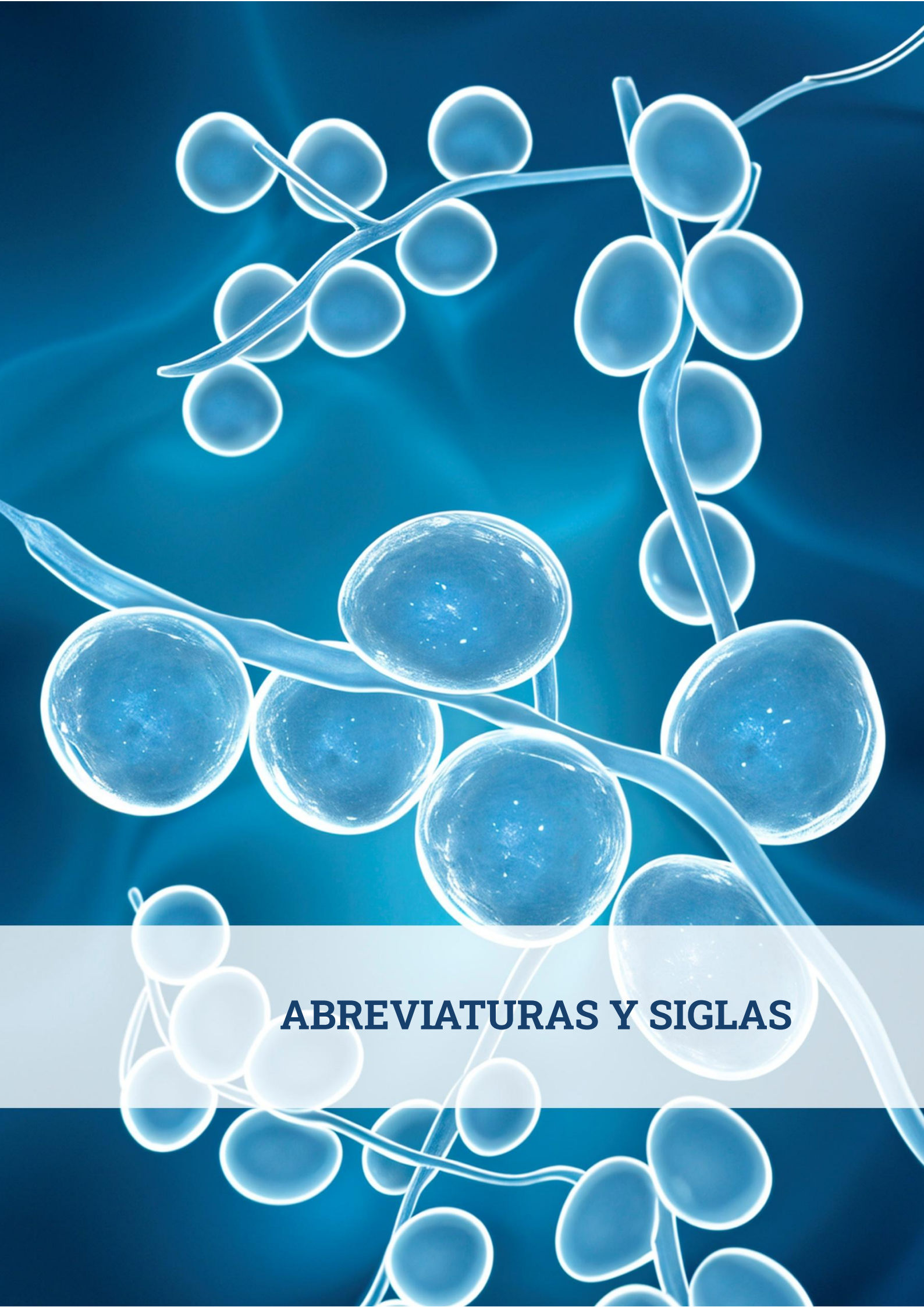
Para el tratamiento de la queratitis fúngica, se han formulado tres sistemas con CSP al 0,50%: una solución salina, una solución con poloxámero 407 (P407) al 0,20% y un hidrogel de P407 al 18%. En la candidiasis oral, se han diseñado enjuagues bucales con saliva artificial (ASM) y jarabe simple, hidrogeles de chitosán al 2% y P407 al 20%, además de una pasta grasa. Todas las formulaciones contienen CSP al 2%. Para el tratamiento de la candidiasis vulvovaginal, se han preparado hidrogeles con CSP al 2%, utilizando chitosán

al 2%, P407 al 20% y una combinación de ambos. Finalmente, en la candidiasis cutánea, se han desarrollado dos geles con CSP al 2% formulados con chitosán y P407, al 2 y 18%, respectivamente. Uno de ellos con promotores de permeación: Azona y Transcutol-P, ambos al 5%.

Las formulaciones han sido sometidas a un análisis fisicoquímico detallado, evaluando sus propiedades reológicas, capacidad de gelificación y mucoadhesión. Además, se realizaron estudios biofarmacéuticos para determinar su liberación, permeabilidad y retención en los tejidos, complementados con ensayos de tolerancia y actividad antifúngica frente a *Candida* spp.

Los resultados indicaron que, para el tratamiento de la queratitis fúngica, la solución salina con P407 al 0,20 % fue la formulación más prometedora, al equilibrar estabilidad, seguridad, permeabilidad y eficacia antifúngica. En la candidiasis oral, todas las formulaciones resultaron efectivas, destacando el hidrogel de chitosán por su estabilidad, capacidad mucoadhesiva y liberación controlada del fármaco. Para la candidiasis vulvovaginal, la combinación de chitosán y P407 mejoró la adhesión y permitió una liberación sostenida del principio activo. En la candidiasis cutánea, la incorporación de promotores de permeación incrementó la retención del fármaco en la piel, optimizando su eficacia sin comprometer la seguridad.

Palabras clave: Caspofungina, infecciones mucocutáneas, administración tópica, candidiasis, nuevos sistemas de liberación y terapia antifúngica

The background of the slide is a microscopic image of biological cells, likely bacteria or fungi, rendered in a monochromatic blue color. The cells are spherical and some are connected by thin, thread-like filaments. The lighting creates a sense of depth, with some cells appearing more prominent than others.

ABREVIATURAS Y SIGLAS

ABPA	Aspergilosis pulmonar alérgica
AEMPS	Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios
API	Aspergilosis pulmonar invasiva
ASM	Saliva artificial
ATC	Clasificación anatómica-terapéutica-química
CIMA	Central de Información de Medicamentos
CMC	Concentración micelar crítica
CMI	Concentración mínima inhibitoria
CMT	Temperatura crítica micelar
CSP	Caspofungina
C_{ss}	Concentración plasmática en estado estacionario
FTIR	Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier
HET-CAM	Método de la membrana corioalantoidea del embrión de gallina o Hen's Egg Test – Chorioallantoic Membrane
K_p	Coefficiente de permeación
LCST	Temperatura crítica inferior de disolución
P407	Poloxamer 407
PEO	Poli (óxido de etileno)
PPO	Poli (óxido de propileno)
PTA	Probabilidad de alcanzar el objetivo terapéutico
SC	Superficie corporal
SCH	Hidratación del estrato córneo
SEM	Microscopia electrónica de barrido
SNC	Sistema nervioso central
SVF	Fluido vaginal simulado
TEWL	Pérdida transepidérmica de agua o a través de la piel
T_1	Tiempo de retraso
TMWL	Pérdida transmucosa de agua o través de la mucosa bucal
TOWL	Pérdida transocular de agua o través del ojo
UCI	Unidad de cuidados intensivos
UCST	Temperatura crítica superior de disolución
VIH/SIDA	Virus de la inmunodeficiencia humana / síndrome de inmunodeficiencia adquirida
ZP	Potencial zeta

A microscopic image of yeast cells, likely Saccharomyces cerevisiae, showing individual cells and chains of cells. The cells are spherical and have a distinct cell wall. The background is a deep blue with some lighter blue, wavy patterns. A semi-transparent grey horizontal band is positioned across the middle of the image, containing the title.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Principales infecciones causadas por hongos

En las últimas décadas, la incidencia de infecciones por hongos oportunistas ha aumentado significativamente, constituyendo un grave problema de salud pública. Estas enfermedades representan, a día de hoy, una de las principales causas de morbilidad y mortalidad a nivel mundial, afectando especialmente a personas hospitalizadas con enfermedades graves o inmunodeprimidas. Algunos factores como el uso de antibióticos de amplio espectro, las hospitalizaciones prolongadas, el uso de nutrición parenteral, el aumento de la esperanza de vida y la diabetes han contribuido a este incremento (Jenks et al., 2020; Wiederhold, 2021). Además, la capacidad de los hongos oportunistas para desarrollar resistencia a los tratamientos antifúngicos existentes complica aún más la situación. Los avances médicos, que por un lado han permitido prolongar la vida de los pacientes con enfermedades crónicas y debilitantes, por otro han aumentado la población susceptible a estas infecciones (Jenks et al., 2020).

Las infecciones fúngicas pueden manifestarse de manera superficial o invasiva, siendo estas últimas especialmente mortales, a pesar de la amplia gama de agentes antifúngicos disponibles. Históricamente, las infecciones fúngicas en humanos han sido muy raras (Köhler et al., 2017). De los aproximadamente 5 millones de especies de hongos que habitan actualmente en la tierra, solo un grupo muy pequeño se ha vinculado con enfermedades en humanos, y aún menos son considerados patógenos primarios.

Los hongos patógenos no forman un grupo monofilético, y su capacidad de causar enfermedades ha surgido varias veces de manera independiente en la evolución (Köhler et al., 2017; Powers-Fletcher et al., 2016). El uso extensivo de los agentes antimicóticos en tratamientos empíricos y profilácticos, justificado por el mal pronóstico de ciertas infecciones, ha conducido al aumento de cepas con baja sensibilidad o resistencia a los principales antifúngicos de uso clínico. Además, también está aumentando el número de hongos asociados a infecciones en humanos, animales y plantas, lo que ha provocado cambios importantes en la epidemiología de las infecciones fúngicas en los últimos años. No obstante, las especies de los géneros *Candida*, *Aspergillus* y *Cryptococcus* siguen siendo las más frecuentes (Jenks et al., 2020; Wiederhold, 2021).

Los hongos son organismos eucariotas, pertenecientes al reino Fungi, que pueden actuar como saprofitos, obteniendo nutrientes de materia orgánica en descomposición, o como parásitos, extrayendo nutrientes de un huésped vivo. Estos microorganismos pueden ser patógenos tanto de plantas como de animales, afectando significativamente la agricultura y la medicina (Powers-Fletcher et al., 2016). Se distinguen por su capacidad de adoptar diferentes modos de crecimiento, aunque generalmente solo exhiben dos formas: crecimiento filamentoso o crecimiento levaduriforme. Esta clasificación morfológica es esencial para comprender la diversidad (Wendland, 2001).

A continuación, se describen las principales características de las infecciones más habituales que provocan.

1.1.1. Infecciones causadas por hongos filamentosos

Los hongos filamentosos (Figura 1), también conocidos como mohos, constituyen un grupo diverso y omnipresente de organismos que se caracteriza por la extensión apical de sus filamentos ramificados, conocidos como hifas. Las hifas constituyen estructuras filamentosas que pueden presentar o no ramificaciones. Estas estructuras pueden ser septadas, caracterizadas por divisiones transversales que segregan los segmentos celulares, o cenocíticas, es decir, carecen de divisiones internas. El proceso de crecimiento implica la elongación de las hifas desde su extremo apical, permitiendo al hongo expandirse y colonizar sustratos adecuados. A medida que las hifas progresan en su desarrollo, se entrelazan para formar una red intrincada conocida como micelio. Este micelio representa la estructura vegetativa del hongo y puede manifestarse de manera superficial o, alternativamente, penetrar profundamente en el sustrato. La ramificación de las hifas durante este proceso, así como las características de dicha ramificación, son utilizadas para diferenciar y clasificar diversos grupos de hongos filamentosos (Powers-Fletcher et al., 2016; Roberson, 2020).

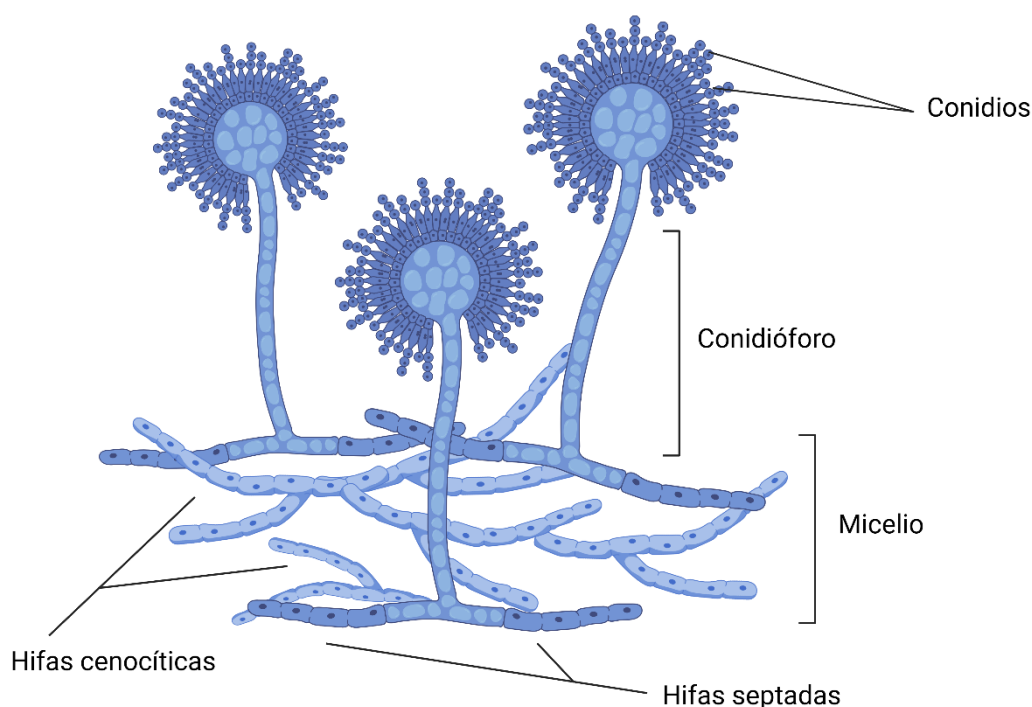


Figura 1. Anatomía de los hongos filamentosos.

El ciclo de vida de los mohos es complejo y puede variar entre diferentes especies, aunque generalmente sigue un patrón similar que incluye varias etapas clave. La primera

etapa es la germinación de las esporas. Los mohos se reproducen a través de esporas, unidades reproductivas que pueden producirse asexual o sexualmente. Para que la germinación se lleve a cabo, las esporas deben dispersarse por el ambiente y existir condiciones favorables, como puede ser la humedad. La germinación implica la absorción de agua y la ruptura de la pared de la espora, dando lugar al crecimiento de un tubo germinativo. En la segunda etapa, este tubo se alarga y ramifica, formando el micelio. A medida que este crece y se expande, puede diferenciarse en estructuras especializadas: algunas partes pueden formar estructuras reproductoras como conidióforos o esporangióforos, responsables de la producción de nuevas esporas. Los conidióforos son estructuras microscópicas que producen asexualmente miles de esporas llamadas conidios. Estos conidios se encuentran en el extremo de las hifas y se elevan en el aire para esparcir las esporas con más eficiencia. Pueden ser de un filamento o ramificados y se localizan aislados o en conidiomas. Por otro lado, los esporangióforos son hifas aéreas que cumplen funciones importantes de formación, sostén y pedúnculo de los esporangios. Los esporangios son estructuras en forma de sacos que contienen las esporas (Oiartzabal-Arano et al., 2016; Powers-Fletcher et al., 2016; Son et al., 2023). La reproducción asexual es el método principal de propagación, el hongo produce esporas asexuales que son liberadas para iniciar un nuevo ciclo de vida, aunque algunos también se reproducen sexualmente. Este complejo proceso comienza con la plasmogamia, etapa donde dos micelios compatibles se fusionan, y con ello sus citoplasmas. La siguiente etapa se conoce como cariogamia, los núcleos de las hifas fusionadas también se unen para dar lugar a un cigoto diploide. Este cigoto produce esporas sexuales, como ascosporas o basidiosporas. Cuando estas esporas se dispersan y, bajo condiciones favorables, germinan para formar nuevos micelios haploides. Algunos hongos filamentosos tienen ciclos de vida con alternancia de generaciones, donde hay una fase haploide dominante y otra diploide dominante. Este ciclo asegura la diversidad genética y la adaptabilidad de los hongos a diferentes entornos. (Cole, 1996; Powers-Fletcher et al., 2016)

En el ecosistema, los hongos filamentosos son esenciales para descomponer materia orgánica y reciclar nutrientes, y muchas especies forman micorrizas, relaciones simbióticas con plantas, que mejoran la absorción de nutrientes por parte de estas. En la industria, son valorados por producir antibióticos como la penicilina, derivada del género *Penicillium*, y por su papel en la fermentación de alimentos y bebidas como quesos y vinos (Köhler et al., 2017).

Aunque la mayoría de los hongos filamentosos no son patógenos, algunas especies pueden causar infecciones en humanos y animales. Varios géneros de hongos filamentosos constituyen a día de hoy un problema de salud, especialmente en individuos inmunocomprometidos. Entre las enfermedades más relevantes se encuentran:

- **Aspergilosis.**

La aspergilosis es una infección causada por hongos del género *Aspergillus*, siendo las especies más comunes *A. fumigatus*, *A. flavus*, *A. niger*, y *A. terreus*. Afecta principalmente al sistema respiratorio y puede variar en gravedad y síntomas. Los individuos con sistemas inmunitarios debilitados, como pacientes con neutropenia, tratados con quimioterapia o con enfermedades pulmonares subyacentes están en mayor riesgo. La incidencia ha aumentado en los últimos años debido al incremento de procedimientos médicos invasivos y el uso extendido de terapias inmunosupresoras. La mortalidad relacionada a esta infección sigue siendo elevada, sobre todo en personas con inmunosupresión severa (Cadena et al., 2021; Machado et al., 2024).

Es causada por la inhalación de esporas, que al ingresar al tracto respiratorio pueden adherirse y germinar en los pulmones. La capacidad del hongo para evadir el sistema inmunológico y su capacidad de invasión de los tejidos se deben a factores de virulencia como la producción de toxinas, la capacidad de crecimiento a temperaturas corporales y la formación de conidios. En individuos inmunocompetentes, las esporas son eliminadas por el sistema inmunológico, mientras que, en los inmunocomprometidos, pueden invadir tejidos y diseminarse a otros órganos (Cadena et al., 2021; Machado et al., 2024).

La aspergilosis es responsable de diversos cuadros clínicos y su presentación depende tanto del lugar afectado como de la respuesta inmunitaria del huésped:

- **Manifestaciones pulmonares.** Entre las formas no invasivas se encuentra el aspergiloma, que se forma en cavidades pulmonares preexistentes, como las causadas por tuberculosis o enfisema. Los síntomas pueden incluir tos, a veces con sangre, sibilancias, falta de aire, pérdida de peso y fatiga (Harmouchi et al., 2020). La aspergilosis broncopulmonar alérgica (ABPA) es común en personas con asma o fibrosis quística y se manifiesta con fiebre, tos con sangre o tapones de moco, y empeoramiento del asma. La aspergilosis pulmonar crónica afecta a personas con enfermedades pulmonares subyacentes y se caracteriza por una infección persistente que puede causar síntomas como tos crónica, pérdida de peso y fatiga (Cadena et al., 2021; Denning et al., 2016). En cuanto a las formas invasivas, la aspergilosis pulmonar invasiva (API) afecta principalmente a personas con sistemas inmunitarios debilitados, como pacientes de quimioterapia o trasplante de médula ósea. Los síntomas incluyen fiebre, escalofríos, tos con sangre, dolor en el pecho y dificultad para respirar. La aspergilosis traqueobronquial es una infección que afecta la tráquea y los bronquios, también común en personas inmunocomprometidas (Cadena et al., 2021; Machado et al., 2024).
- **Manifestaciones sinusales y del Sistema Nervioso Central (SNC).** Además de las formas pulmonares, la aspergilosis puede afectar otros órganos. La aspergilosis sinusal puede presentarse como una rinosinusitis aspergilar no invasiva, manifestándose como una sinusitis crónica con dolor facial y congestión y descarga nasal. En la forma

invasiva, el hongo invade los tejidos alrededor de los senos paranasales, causando síntomas severos y puede afectar estructuras adyacentes como los ojos y el cerebro (Cadena et al., 2021; Machado et al., 2024). La aspergilosis del SNC incluye la meningitis aspergilar, una infección de las meninges que puede causar cefalea, fiebre, rigidez de nuca y alteraciones neurológicas, y el absceso cerebral, que se presenta con síntomas focales neurológicos, cambios en el estado mental, convulsiones y fiebre (Cadena et al., 2021; Machado et al., 2024).

- **Manifestaciones cutáneas.** La aspergilosis cutánea puede ser primaria, con infección directa de la piel a través de una herida o quemadura, presentándose con lesiones cutáneas dolorosas, eritematosas, necróticas o ulceradas, o secundaria, con diseminación hematógena desde un foco primario pulmonar u otro sitio, manifestándose con lesiones múltiples en la piel que pueden parecerse a úlceras o nódulos (Van Burik et al., 1998).

- **Manifestaciones oftálmicas.** La aspergilosis ocular incluye la endoftalmitis, una infección del interior del ojo que puede causar dolor ocular, disminución de la visión, enrojecimiento y descarga ocular, y la queratomicosis, una infección de la córnea que puede llevar a úlceras corneales, dolor ocular, fotofobia y visión borrosa (Cadena et al., 2021).

- **Manifestaciones cardiovasculares, gastrointestinales y renales.** La aspergilosis cardiovascular puede presentarse como endocarditis, afectando las válvulas del corazón y causando fiebre, soplo cardíaco, insuficiencia cardíaca y síntomas embólicos. La aspergilosis gastrointestinal, aunque rara, se manifiesta con dolor abdominal, fiebre, diarrea y posibles obstrucciones o perforaciones intestinales (Chevalier et al., 2021). La aspergilosis renal puede provocar fiebre, dolor lumbar e insuficiencia renal (Meng et al., 2014).

- **Manifestaciones osteoarticulares.** La aspergilosis osteoarticular incluye osteomielitis (dolor óseo, fiebre e inflamación) y artritis fúngica (dolor articular, hinchazón y limitación del movimiento) (Tsantes et al., 2022).

Tratamiento: El tratamiento de la aspergilosis varía según la forma clínica de la enfermedad, la severidad de la infección y el estado inmunológico del paciente. Los antifúngicos de primera línea incluyen voriconazol, isavuconazol y anfotericina B, mientras que las equinocandinas se utilizan como terapia de rescate. En pacientes inmunocomprometidos, es fundamental optimizar la función inmune mediante la reducción de la inmunosupresión y el uso de factores estimulantes de colonias de granulocitos. La duración del tratamiento suele ser prolongada, especialmente en casos de aspergilosis invasiva o crónica. En algunos casos, puede ser necesaria la intervención quirúrgica para remover tejidos infectados. Además, se recomienda la profilaxis antifúngica en pacientes de alto riesgo. La resistencia antifúngica requiere la realización de pruebas de

sensibilidad y, en ocasiones, el uso de combinaciones de medicamentos (Cadena et al., 2021; Machado et al., 2024).

- **Otras infecciones clínicamente relevantes.**

Después de la aspergilosis, otras infecciones como la mucormicosis, la fusariosis y la escedosporiasis emergen como preocupaciones críticas debido a su alta mortalidad y capacidad para causar enfermedades graves en poblaciones vulnerables. Aunque menos conocidas, estas patologías son responsables de complicaciones significativas en individuos con condiciones subyacentes, como diabetes no controlada, neoplasias hematológicas o trasplantes de órganos.

La mucormicosis, también conocida como la enfermedad del “hongo negro”, es causada por hongos del orden Mucorales, que incluye géneros como *Rhizopus*, *Rhizomucor* y *Mucor*. Estos hongos se encuentran comúnmente en materia orgánica en descomposición, como pan, frutas y vegetales (Steinbrink & Miceli, 2021). Aunque rara, afecta principalmente a individuos con diabetes no controlada, cáncer o en tratamiento con inmunosupresores. La infección puede progresar rápidamente, y sus manifestaciones clínicas varían desde la invasión de los senos paranasales y el cerebro hasta infecciones cutáneas y diseminadas (Reid et al., 2020; Steinbrink & Miceli, 2021). El tratamiento requiere intervención urgente con anfotericina B liposomada o isavuconazol, junto con desbridamiento quirúrgico para eliminar el tejido necrótico. El control de comorbilidades como la diabetes es esencial para mejorar el pronóstico (Reid et al., 2020).

La fusariosis, por otro lado, es ocasionada por especies del género *Fusarium*. La infección puede ocurrir por inhalación de esporas o a través de heridas en la piel. En los inmunodeprimidos, se disemina rápidamente, afectando piel, pulmones y senos paranasales, con síntomas como fiebre, lesiones cutáneas necróticas y dificultad respiratoria (M. Nucci & Anaissie, 2023). El tratamiento de la fusariosis suele incluir anfotericina B liposomal o voriconazol, pero la frecuente resistencia a antifúngicos obliga a combinar terapias y reforzar el sistema inmunológico del paciente. El diagnóstico, por otro lado, es complicado debido a la similitud de los síntomas con los de otras infecciones (F. Nucci et al., 2015; M. Nucci & Anaissie, 2023).

La escedosporiosis, causada principalmente por especies del género *Scedosporium*, es otra infección micótica que muestra un aumento en su incidencia, particularmente en pacientes con enfermedades pulmonares crónicas o trasplantes de órganos. Las manifestaciones de esta infección pueden ser amplias, afectando no solo la piel y los pulmones, sino también el SNC y otras áreas del cuerpo (Cortez et al., 2008; Rougeron et al., 2018). El tratamiento incluye voriconazol o posaconazol, aunque a veces se combina con anfotericina B o equinocandinas debido a la resistencia antifúngica. En casos graves, puede ser necesaria la intervención quirúrgica (Cortez et al., 2008; Rougeron et al., 2018).

Además de estas, otros hongos clínicamente relevantes, como *Alternaria*, *Penicillium* y *Cladophialophora*, también pueden provocar infecciones significativas en individuos inmunocomprometidos. *Alternaria* es un género de hongos con numerosas especies, principalmente saprófitas o patógenas de plantas. En humanos, se relaciona con enfermedades respiratorias alérgicas y diversas infecciones oportunistas en individuos inmunodeprimidos, incluyendo queratitis, peritonitis, osteomielitis y sinusitis (Alastruey-izquierdo et al., 2011).

Por otro lado, *Penicillium* es conocido por su papel en la producción de penicilina, el primer antibiótico descubierto por Alexander Fleming en 1928 a partir de *P. notatum*. Algunas especies, como *P. roqueforti* y *P. camemberti*, se utilizan en la producción de quesos. Aunque la mayoría no son patógenas, algunas pueden causar infecciones en humanos induciendo problemas respiratorios, alergias y, en casos raros, infecciones invasivas como la penicilosis (Lobanovska & Pilla, 2017; F. Wang et al., 2023).

Finalmente, *Cladophialophora* es un género de hongos que se caracterizan por su pigmentación oscura debido a la presencia de melanina en sus paredes celulares. La especie más conocida y clínicamente relevante es *C. bantiana*, que puede provocar infecciones del sistema nervioso central, incluyendo abscesos cerebrales. El tratamiento de estas infecciones puede ser complicado debido a la resistencia de algunos hongos a los antifúngicos comunes. Las opciones de tratamiento incluyen medicamentos como itraconazol, voriconazol y anfotericina B (Cortés et al., 2021).

A continuación, se presenta una tabla resumen que condensa las principales características y manifestaciones de estas infecciones fúngicas, facilitando una comprensión más clara de su impacto en la salud.

Tabla 1. Otras infecciones causadas por hongos filamentosos de relevancia clínica.

Infección	Especies y géneros relevantes	Manifestaciones clínica	Tratamiento	Referencias
Mucormicosis	<i>Rhizopus</i> <i>Rhizomucor</i> <i>Mucor</i>	Fiebre, dolor facial, tos, disnea, úlceras cutáneas, dolor abdominal, vómitos, infección en múltiples órganos.	Anfotericina B Isavuconazol Desbridamiento quirúrgico	(Addasi et al., 2023; Bhandari et al., 2023; Reid et al., 2020; Steinbrink & Miceli, 2021)
Fusariosis	<i>Fusarium</i> - <i>F. solani</i> - <i>F. Oxysporum</i> - <i>F. verticillioideis</i> - <i>F. proliferatum</i>	Úlceras cutáneas, nódulos, neumonía, disnea, congestión, dolor facial, fungemia, fiebre, mialgias, fiebre persistente.	Voriconazol Anfotericina B Tratamientos combinados	(F. Nucci et al., 2015; M. Nucci & Anaissie, 2023)
Escedosporiosis	<i>Scedosporium</i> - <i>S. apiospermum</i> - <i>S. prolificans</i>	Micetoma, artritis séptica, neumonía, peritonitis, meningocefalitis, sinusitis, queratitis.	Voriconazol Anfotericina B Limpieza quirúrgica de lesiones	(Cortez et al., 2008; McCarthy et al., 2018; Rougeron et al., 2018)
Alternariosis	<i>Alternaria</i> - <i>A. alternata</i> - <i>A. infectoria</i>	Asma, neumonía, dermatitis, queratitis, sinusitis, infecciones sistémicas, fiebre y malestar.	Clotrimazol Miconazol Itraconazol Voriconazol Anfotericina B	(Alastruey-izquierdo et al., 2011)
Penicilliosis	<i>Penicillium</i> - <i>P. marneffei</i>	Fiebre, pérdida de peso, linfadenopatía, lesiones cutáneas, afectaciones pulmonares, diseminación a otros órganos.	Anfotericina B Itraconazol Manejo de la inmunosupresión	(Lobanovska & Pilla, 2017; F. Wang et al., 2023)
Cladophialophorosis	<i>Cladophialophora</i> - <i>C. bantiana</i>	Manifestaciones cutáneas como pápulas y/o nódulos, infecciones pulmonares, osteomielitis, fungemia en casos severos.	Anfotericina B Itraconazol Tratamiento quirúrgico en infecciones severas	(Cortés et al., 2021)

1.1.2. Infecciones causadas por hongos levaduriformes

Los hongos levaduriformes (Figura 2), comúnmente conocidos como levaduras, constituyen un grupo diverso y ubicuo de organismos que se caracterizan principalmente por su forma unicelular. Las levaduras son generalmente esféricas, elípticas u ovaladas de unos pocos micrómetros de diámetro y presentan una estructura bastante compleja y organizada. (Knop, 2011).

A diferencia de los hongos filamentosos, las levaduras no forman hifas, sino que se reproducen principalmente de manera asexual mediante gemación o fisión binaria. Durante la gemación, una célula madura, también conocida como madre genera una yema que crece y se separa para formar una nueva célula hija. Esta yema crece hasta alcanzar aproximadamente dos tercios del tamaño de la célula madre antes de que sus citoplasmas se desconecten físicamente en un proceso llamado citocinesis. Este método de reproducción es característico de muchas especies de levaduras, especialmente aquellas pertenecientes a la familia *Saccharomyces*, conocido por especies como *S. cerevisiae*.

En la fisión binaria, la célula madre se divide en dos células hijas idénticas. Durante este proceso, la célula madre se alarga y su núcleo se divide por mitosis, a continuación, la célula se constriñe en el centro, formando un septo que separa las dos nuevas células hijas. Este proceso permite a las levaduras crecer y multiplicarse rápidamente en ambientes adecuados. La fisión es un proceso más similar a la división celular clásica observada en bacterias y muchas células de mamíferos. Este método permite una distribución equitativa del contenido celular entre las células hijas y es característico de algunas levaduras del género *Schizosaccharomyces*, como es *S. pombe* (Knop, 2011).

Aunque la mayoría de las levaduras existen como células individuales, algunas especies pueden experimentar una transición cambiando el crecimiento unicelular a pseudohifas en respuesta a condiciones ambientales adversas. La transición pseudohifal incluye un cambio en el patrón de gemación y la formación de cadenas de células alargadas que permiten a las células buscar nutrientes lejos del lugar inicial de colonización. Las pseudohifas forman nuevas células mediante gemación y mantienen contactos célula-célula débiles tras la citocinesis. Este proceso es particularmente relevante en levaduras patógenas como *C. albicans* (Knop, 2011).

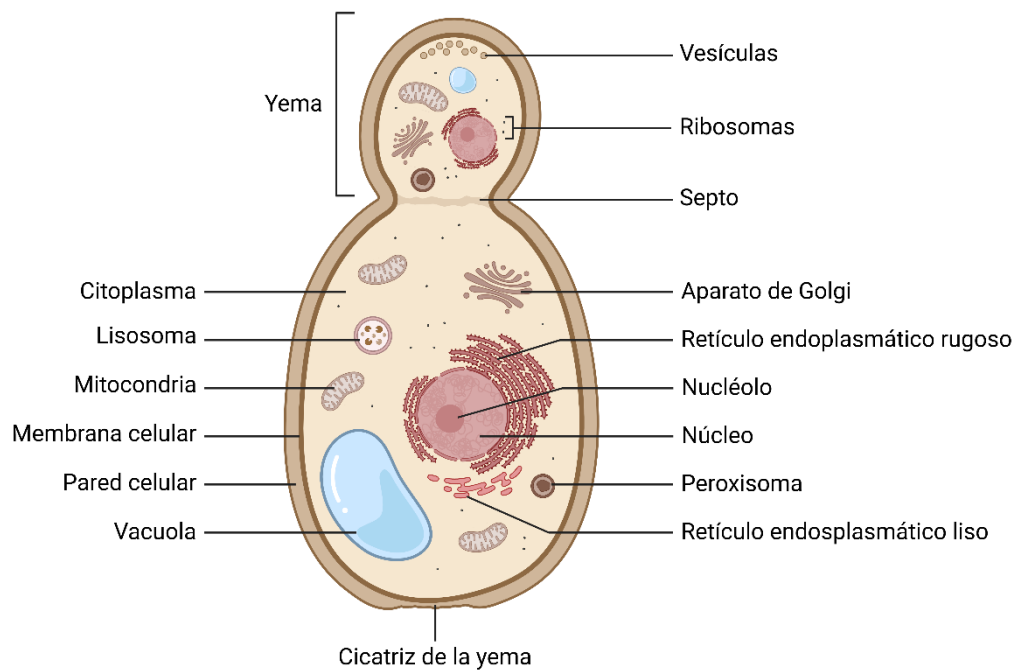


Figura 2. Anatomía de los hongos levaduriformes

La reproducción sexual en las levaduras es un proceso crucial que implica la meiosis y la formación de esporas, permitiendo la recombinación genética y la generación de diversidad. Durante la esporulación, las células diploides sufren meiosis, produciendo cuatro células haploides que se encapsulan en estructuras resistentes llamadas ascosporas, en el caso de *S. cerevisiae*, o basidiosporas, en el caso de especies como *Cryptococcus neoformans*. Estas esporas pueden germinar bajo condiciones favorables, creciendo como células haploides que se dividen asexualmente o fusionándose con otras haploides de tipo de apareamiento opuesto para formar una nueva célula diploide (Knop, 2011).

Las levaduras tienen una gran importancia tanto clínica como ambiental. Ambientalmente, las levaduras juegan roles cruciales como descomponedoras en la naturaleza y tienen un uso industrial significativo. Son esenciales en la producción de pan, cerveza, vino y en la biotecnología para la producción de bioetanol y otros productos químicos (Eliodório et al., 2019). Clínicamente, pueden causar una variedad de infecciones en humanos, especialmente en individuos con sistemas inmunológicos comprometidos. Estas infecciones pueden variar desde superficiales, como la candidiasis oral y vaginal, hasta sistémicas severas, como la candidemia y la meningitis criptocócica (Caetano et al., 2023).

Dado que la candidiasis, debido a su complejidad y prevalencia, requiere un análisis detallado, se ha asignado un apartado exclusivo para su estudio.

A continuación, se abordarán otras infecciones importantes causadas por levaduras de relevancia clínica, incluyendo aspectos clave sobre su identificación, manejo clínico y estrategias para minimizar su impacto.

- Criptococosis

La criptococosis es una infección fúngica causada por hongos del género *Cryptococcus*, principalmente por *C. neoformans* y *C. gattii*. Estos patógenos son levaduras encapsuladas, se encuentran rodeadas por una capa externa de polisacáridos que le proporciona protección contra el sistema inmunológico del huésped, resistencia a condiciones ambientales adversas y facilita su diseminación en el cuerpo, ampliamente distribuidas en el medio ambiente (Kakizaki & Melhem, 2023; Maziarz & Perfect, 2016). *C. neoformans* se encuentra predominantemente en excrementos de aves, especialmente palomas, y en suelos contaminados. Es más común en áreas urbanas y afecta principalmente a personas con sistemas inmunitarios debilitados, como pacientes en tratamiento inmunosupresor o con enfermedades crónicas. Por otro lado, *C. gattii* se asocia más frecuentemente con regiones tropicales y subtropicales, y puede infectar tanto a personas inmunocompetentes como a aquellas con sistemas inmunitarios comprometidos (Kakizaki & Melhem, 2023).

La infección ocurre cuando se inhalan esporas del medio ambiente y estas se depositan en los alvéolos pulmonares. La infección inicial suele ser asintomática o leve y el cuerpo puede eliminarla. Sin embargo, en algunos casos el hongo puede establecer una infección latente en los nódulos linfáticos o granulomas pulmonares. Cuando la inmunidad se debilita, el hongo puede crecer y diseminarse. *C. gattii* suele causar infecciones pulmonares granulomatosas, mientras que *C. neoformans* tiende a diseminarse al sistema nervioso central. En personas con inmunidad severamente comprometida, las levaduras pueden proliferar y extenderse a otros órganos a través del torrente sanguíneo (Maziarz & Perfect, 2016).

Las manifestaciones clínicas de la criptococosis varían según la vía de infección y el estado inmunológico del paciente:

- **Manifestaciones pulmonares.** Las formas más comunes incluyen criptococosis pulmonar, meningitis criptocócica y criptococosis diseminada. En individuos inmunocompetentes, la infección puede ser asintomática o presentarse como una neumonía leve. Sin embargo, en personas inmunocomprometidas, la criptococosis puede manifestarse como una neumonía severa, con síntomas que incluyen tos, dolor torácico, dificultad para respirar y fiebre (Gushiken et al., 2021).
- **Manifestaciones neurológicas.** La meningitis es la forma más común y grave de la enfermedad, especialmente en pacientes con virus de la inmunodeficiencia humana/síndrome de inmunodeficiencia adquirida (VIH/SIDA). Sus síntomas incluyen dolor de cabeza severo, fiebre, rigidez de cuello, náuseas y vómitos, alteraciones del estado mental, sensibilidad a la luz y en casos severos, pérdida de visión y audición. Cuando la infección se disemina desde el sitio primario de infección, generalmente los pulmones, a otros órganos, se habla de criptococosis diseminada. Los síntomas pueden

incluir afectación de múltiples órganos como la piel, ojos, próstata, huesos y otros tejidos, junto con síntomas sistémicos como fiebre, pérdida de peso y fatiga (Gushiken et al., 2021).

- **Manifestaciones cutáneas.** La criptococosis cutánea es una manifestación más rara, pero puede presentarse con lesiones cutáneas que varían desde pápulas hasta úlceras y abscesos. Estas lesiones pueden parecerse a las de otras infecciones cutáneas o enfermedades dermatológicas (Noguchi et al., 2019).
- **Manifestaciones oculares.** En raras ocasiones, *Cryptococcus* puede causar infecciones oculares directas como coriorretinitis, vitritis, endoftalmitis y conjuntivitis granulomatosa. Los síntomas incluyen disminución de la agudeza visual, pérdida repentina de visión, cuerpos flotantes en el campo visual y dolor, que pueden ser unilaterales o bilaterales, y ocurrir como una infección aislada o junto con meningitis criptocócica.
- **Manifestaciones urológicas y gastrointestinales.** La infección criptocócica de la próstata es frecuentemente asintomática, aunque ocasionalmente puede presentarse con disuria o uropatía obstructiva. Además, se han reportado infecciones criptocócicas en el tracto gastrointestinal (Gushiken et al., 2021).
- **Manifestaciones osteoarticulares.** La criptococosis ortopédica afecta tanto a individuos inmunocomprometidos como a inmunocompetentes, siendo el uso prolongado de corticosteroides un factor de riesgo común en los primeros. La osteomielitis ocurre con mayor frecuencia en las vértebras y huesos largos, siendo la rodilla la articulación más afectada.

Tratamiento: El tratamiento de la infección criptocócica severa, incluida la meningoencefalitis, se basa en el uso de anfotericina B. Se prefiere la anfotericina B liposomal por su menor toxicidad renal, especialmente en pacientes con riesgo de problemas renales. Para optimizar la eficacia del tratamiento, se emplea flucitosina en combinación con anfotericina B, lo cual favorece una rápida esterilización del líquido cefalorraquídeo y contribuye a la reducción de la mortalidad. Es crucial no interrumpir el tratamiento de manera prematura, ya que esto puede empeorar los resultados. Otra combinación sumamente eficaz es la de anfotericina B con fluconazol, la cual optimiza la eliminación del hongo y favorece la recuperación neurológica. Antifúngicos como itraconazol, voriconazol y posaconazol no se recomiendan como tratamiento de primera línea debido a sus limitaciones en eficacia y disponibilidad, aunque pueden resultar útiles en casos difíciles de tratar (Kakizaki & Melhem, 2023; Maziarz & Perfect, 2016).

- **Otras infecciones clínicamente relevantes.**

Además de la criptococosis, emergen otras infecciones fúngicas como la trichosporonosis y la rhodotorulosis que representan preocupaciones críticas en pacientes inmunocomprometidos. Aunque menos conocidas, estas infecciones son responsables de

complicaciones importantes en individuos con condiciones subyacentes, como cáncer hematológico, trasplantes de órganos o tratamientos prolongados con inmunosupresores.

La trichosporonosis es una infección fúngica provocada por especies del género *Trichosporon*, presentes de manera ubicua en el ambiente, particularmente en suelos, agua y vegetación en descomposición. Puede colonizar la piel, el tracto gastrointestinal y el tracto respiratorio. La patogénesis de esta enfermedad se relaciona con la invasión de tejidos a través de microtraumas o dispositivos médicos, donde *Trichosporon* forma biofilms que dificultan el tratamiento (Mehta et al., 2021; S. Singh et al., 2019). Las infecciones pueden ser superficiales, como la piedra blanca y la onicomycosis, o invasivas, manifestándose como abscesos cerebrales, meningitis y neumonía en pacientes críticos. La prevención se centra en minimizar factores de riesgo y un manejo adecuado de los dispositivos médicos, mientras que el tratamiento requiere una cuidadosa selección de antifúngicos, con el voriconazol como opción preferente en infecciones sistémicas (S. C. A. Chen et al., 2021; Mehta et al., 2021).

La rhodotorulosis, provocada por especies del género *Rhodotorula*, puede causar infecciones como fungemia y peritonitis, especialmente en aquellos con catéteres intravenosos o en diálisis peritoneal. Las infecciones pueden manifestarse con síntomas sistémicos, siendo difícil de distinguir de otras patologías en este grupo de pacientes (Cobo et al., 2020; Hirano et al., 2022). El tratamiento implica el uso de antifúngicos como la anfotericina B, debido a la resistencia de *Rhodotorula* a muchos azoles comunes (Hirano et al., 2022).

Malassezia y *Saprochaete* son otros géneros que pueden tener un impacto significativo en la salud humana. *Malassezia* está frecuentemente asociada con diversas infecciones cutáneas, tales como la pitiriasis versicolor, la dermatitis seborreica y la foliculitis (Saunte et al., 2020). En individuos inmunocomprometidos puede provocar infecciones sistémicas, especialmente en aquellos que reciben nutrición parenteral total. El tratamiento puede requerir el uso de antifúngicos como itraconazol y ketoconazol, aunque la elección dependerá del tipo específico de hongo y la localización de la infección (Theelen et al., 2018).

Por su parte, *Saprochaete* es conocida por causar infecciones graves, especialmente en pacientes con leucemia o que han recibido trasplantes de médula ósea (Zein et al., 2020). Las infecciones pueden presentarse en forma de fungemia, endocarditis, neumonía y otras infecciones profundas. Su tratamiento resulta complicado y está asociado con una elevada tasa de mortalidad. Por lo general se utilizan antifúngicos como anfotericina B, voriconazol y posaconazol, aunque la resistencia a los antifúngicos puede ser un desafío considerable (Zein et al., 2020).

A continuación, se presenta una tabla resumen que condensa las principales características y manifestaciones de estas infecciones fúngicas, facilitando una comprensión más clara de su impacto en la salud.

Tabla 2. Otras infecciones causadas por hongos levaduriformes de relevancia clínica.

Infección	Especies y géneros relevantes	Manifestaciones clínica	Tratamiento	Referencias
Trichosporonosis	<i>Trichosporon</i>			
	- <i>T. asahii</i> - <i>T. asteroides</i> - <i>T. cutaneum</i> - <i>T. mucoides</i> - <i>T. inkin</i> - <i>T. ovoides</i>	Fiebre, dolor facial, tos, disnea, úlceras cutáneas, dolor abdominal, vómitos, abscesos cerebrales, meningitis, endoftalmitis, neumonía.	Voriconazol Posaconazol Tratamientos combinados	Mehta 2021 Gaurav 2022
Rhodotorulosis	<i>Rhodotorula</i>			
	- <i>R. mucilaginosa</i> - <i>R. glutinis</i> - <i>R. minuta</i>	Fungemia, peritonitis, meningitis, endoftalmitis, infecciones en piel, pulmones y vías urinarias.	Anfotericina B Fluconazol	Wirth y goldani 2012 Cobo 2020 Hirano 2022 Franconieri 2018
Malasseziosis	<i>Malassezia</i>			
	- <i>M. furfur</i> - <i>M. globosa</i> - <i>M. restricta</i>	Pitiriasis versicolor, dermatitis seborreica, foliculitis, fungemia en inmunocomprometidos.	Itraconazol Ketoconazol	Ianiri 2022 Theelen 2018 Saunte 2020
Infección por Saprochaete	<i>Saprochaete</i>			
	- <i>S. capitata</i> - <i>S. clavata</i>	Fungemia, endocarditis, neumonía, infecciones profundas.	Anfotericina B Voriconazol Posaconazol	Zein 2020

1.2. Candidiasis

Candida es un grupo de hongos levaduriformes que forman parte de la microbiota normal del cuerpo humano, colonizando áreas como la piel, la boca y el tracto gastrointestinal y genitourinario. Aunque generalmente son comensales, pueden convertirse en patógenos oportunistas, especialmente en individuos con sistemas inmunitarios comprometidos (Bhattacharya et al., 2020). Esta infección fúngica es una de las más frecuentes a nivel mundial y afecta tanto a países desarrollados como en vías de desarrollo, aunque la incidencia puede variar según la región y la población afectada. Las personas con sistemas inmunitarios debilitados, como pacientes con VIH/SIDA, cáncer, trasplantes de órganos o en unidad de cuidados intensivos (UCI), son especialmente vulnerables a la candidiasis. El uso de antibióticos de amplio espectro, quimioterapia, esteroides y dispositivos médicos implantados, como catéteres, también incrementa el riesgo. Esta infección es una de las principales causas de infecciones nosocomiales (Clancy & Nguyen, 2018; McCort & Tsai, 2023).

Una de sus características clave es su versatilidad morfológica, ya que puede cambiar de forma entre levadura, pseudohifa e hifa, lo que le permite adaptarse a diferentes entornos y aumentar su capacidad invasiva (Dadar et al., 2018). Además, posee una notable capacidad para adherirse a superficies y formar biofilms, estructuras protectoras que le permiten sobrevivir en ambientes hostiles y resistir tratamientos antifúngicos (Lopes & Lionakis, 2022). Su dimorfismo térmico le permite crecer a diversas temperaturas, lo que facilita su colonización en distintas partes del cuerpo humano (Dadar et al., 2018).

Las infecciones por *Candida* pueden ser causadas por diversas especies, cada una con sus propias características clínicas y patrones de resistencia a agentes antifúngicos. Aunque *C. albicans* es la especie más prevalente, las infecciones por especies no albicans, como *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. krusei* y especialmente *C. auris*, están en aumento, lo que plantea nuevos desafíos para el diagnóstico, tratamiento y control de la candidiasis. Otras especies menos comunes incluyen *C. lusitaniae*, *C. kefyr* y *C. dubliniensis* (Bhattacharya et al., 2020).

- ***C. albicans*.** Forma parte de la microbiota normal del ser humano, habitando en la piel, la cavidad bucal, el tracto gastrointestinal y la vagina. Se trata de un patógeno oportunista, lo que implica que, en condiciones normales, coexiste de manera equilibrada con su huésped sin provocar inconvenientes. Sin embargo, puede convertirse en un agente patógeno en situaciones donde se produzcan alteraciones en el sistema inmunológico o en el entorno local. Responsable de la candidiasis oral, vulvovaginal y candidiasis invasiva y diseminada (Lopes & Lionakis, 2022).
- ***C. glabrata*.** Es la segunda especie más común en infecciones humanas. Se encuentra normalmente en la mucosa bucal y el tracto gastrointestinal. Es especialmente alarmante por su resistencia innata a los azoles (Castrejón-Jiménez et al., 2022). Las

infecciones comunes causadas por *C. glabrata* incluyen la candidiasis urinaria además de la candidemia, infección del torrente sanguíneo que afecta especialmente a pacientes con dispositivos intravasculares (Castrejón-Jiménez et al., 2022).

- ***C. parapsilosis***. Es otra especie prevalente y frecuente en entornos hospitalarios, debido a su habilidad para formar biofilms en superficies inanimadas, como catéteres y otros dispositivos médicos. Es responsable de la candidiasis neonatal, que afecta con frecuencia a los recién nacidos, particularmente en unidades de cuidados intensivos neonatales. También se asocia a infecciones relacionadas con catéteres, que son comunes en pacientes que utilizan dispositivos médicos intravasculares (Branco et al., 2023; Silva et al., 2012).

- ***C. tropicalis***. Se encuentra frecuentemente en áreas tropicales y subtropicales, es notable por su habilidad para formar biofilms tanto en dispositivos médicos como en mucosas, lo que contribuye a su persistencia en entornos clínicos (dos Santos & Ishida, 2023). Es especialmente relevante en pacientes oncológicos sometidos a quimioterapia y en casos de candidiasis sistémica que compromete a múltiples órganos (dos Santos & Ishida, 2023).

- ***C. krusei***. Aunque menos común, es notable por su resistencia intrínseca al fluconazol. Es especialmente prevalente en entornos hospitalarios, donde puede infectar a pacientes con tratamientos prolongados (Jamiu et al., 2021). Las infecciones comunes incluyen candidiasis en pacientes inmunocomprometidos y en aquellos con dispositivos médicos intravasculares o sometidos a procedimientos invasivos (Jamiu et al., 2021).

- ***C. auris***. Finalmente, *C. auris* es la especie emergente más reciente y ha suscitado preocupación global por su resistencia a múltiples antifúngicos incluyendo azoles, equinocandinas y polienos (Watkins et al., 2022). Es difícil de identificar con métodos de laboratorio convencionales, complicando su manejo. Su capacidad para causar brotes en hospitales y la dificultad de controlarla han hecho de *C. auris* un patógeno crítico en la vigilancia de infecciones nosocomiales (Chowdhary et al., 2023; Dahiya et al., 2020). Es un agente causante de candidiasis invasiva, incluyendo la candidemia. Asimismo, puede ocasionar infecciones en heridas y tejidos blandos, lo que resulta especialmente alarmante en pacientes con heridas quirúrgicas o lesiones cutáneas (García et al., 2020).

1.2.1. Patogenicidad

Como se mencionó anteriormente, la presencia habitual de *Candida* en el cuerpo humano no suele causar problemas. Sin embargo, en determinadas circunstancias, estos hongos pueden convertirse en patógenos (Figura 3), lo que puede resultar en diversas infecciones que varían desde formas superficiales hasta casos invasivos. Las infecciones superficiales afectan la cavidad oral, la piel, los genitales, el sistema respiratorio y el tracto gastrointestinal (Mba & Nweze, 2020). La candidiasis invasiva es una infección grave

que puede causar candidemia, meningitis y endocarditis. En pacientes hospitalizados y con sistemas inmunológicos debilitados, la infección invasiva es una causa significativa de morbilidad y mortalidad, con altas tasas de incidencia y prevalencia (D. K. Singh et al., 2020).

Los principales factores de riesgo incluyen sistemas inmunitarios comprometidos, diabetes mal controlada y el uso de dispositivos médicos. La hospitalización prolongada también eleva el riesgo, al igual que la ruptura de barreras físicas como la piel o el tracto gastrointestinal. El desequilibrio de la microbiota, a menudo causado por el uso de antibióticos, permite que *Candida* crezca sin control, además de la resistencia a los antifúngicos, que es cada vez más común (Mba & Nweze, 2020; D. K. Singh et al., 2020).

El proceso de patogénesis de *Candida* es intrincado y depende de múltiples factores, involucrando tanto al huésped como al microorganismo. *Candida* puede adaptarse y sobrevivir en diversos entornos dentro del huésped, evadiendo la respuesta inmune y provocando daño en los tejidos (Mba & Nweze, 2020). Además, posee la capacidad de cambiar su morfología, aspecto clave para su virulencia (Mba & Nweze, 2020).

La invasión de *Candida* en el epitelio es un proceso complejo que comienza con la adhesión del hongo a las células epiteliales. *Candida* utiliza adhesinas para unirse firmemente a las células del huésped, crucial para iniciar la invasión (Mba & Nweze, 2020). Tras adherirse, *Candida* experimenta una transición morfológica, cambiando de su forma de levadura unicelular a una forma filamentosa o hifa. Esta forma filamentosa es especialmente invasiva, ya que las hifas tienen la capacidad de perforar y penetrar las células epiteliales, permitiendo que el hongo se adentre en los tejidos subyacentes (D. K. Singh et al., 2020).

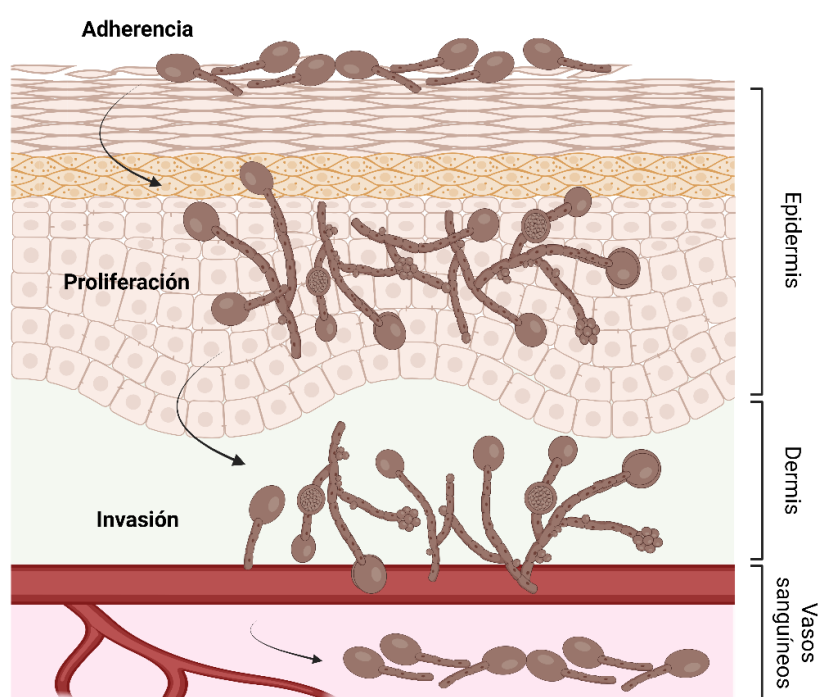


Figura 3. Invasión de tejido por parte de *Candida*.

Simultáneamente, *Candida* secreta enzimas extracelulares, como proteasas, lipasas y fosfolipasas, que degradan los componentes estructurales de las células epiteliales, como proteínas y lípidos (Mba & Nweze, 2020). Esta actividad enzimática rompe las barreras físicas del epitelio, facilitando aún más la invasión del hongo en los tejidos más profundos. Durante este proceso, *Candida* también despliega estrategias para evadir el sistema inmunológico del huésped. El hongo puede evitar la fagocitosis por parte de las células inmunitarias y modificar la respuesta inmune para crear un entorno más favorable para su supervivencia (D. K. Singh et al., 2020). A medida que *Candida* atraviesa el epitelio dañado, puede infiltrarse en tejidos más profundos e incluso ingresar al torrente sanguíneo, lo que puede llevar a infecciones sistémicas graves, como la candidemia (Mba & Nweze, 2020).

Este proceso invasivo es lo que convierte a *Candida* en un patógeno oportunista, capaz de causar infecciones significativas y potencialmente mortales en los humanos, especialmente en aquellos con sistemas inmunitarios comprometidos.

1.2.2. Candidiasis superficiales

La candidiasis superficial es una afección que se desarrolla en las capas externas de la piel y las mucosas, y puede manifestarse en diversas áreas del cuerpo, como la boca, la piel y la región genital, entre otras. Es causada por diversas especies de *Candida*, siendo *C. albicans* la más frecuente. Los síntomas típicos incluyen enrojecimiento, picazón, irritación y la aparición de placas blancas o rojas en la zona afectada (Jayatilake, 2011).

Aunque la candidiasis superficial puede presentarse en personas con un sistema inmunitario sano, es más frecuente en individuos con condiciones que debilitan el sistema inmunológico, como la diabetes, el VIH/SIDA, o en aquellos que están bajo tratamiento con antibióticos o corticoesteroides. Además, factores como el clima cálido y húmedo, la ropa ajustada y la mala higiene pueden favorecer su aparición (Jayatilake, 2011).

El pronóstico depende en gran medida de la rapidez en el inicio del tratamiento y la profundidad de la infección. Un diagnóstico y tratamiento tempranos mejoran significativamente las perspectivas, mientras que los retrasos y la resistencia antifúngica pueden llevar a complicaciones graves (Sha et al., 2021; Sharma et al., 2022). Es crucial identificar y corregir los factores subyacentes, especialmente en pacientes inmunocomprometidos, quienes tienen una mayor tendencia a recurrencias y complicaciones (Jørgensen, 2024; Millsop & Fazel, 2016). En general, las candidiasis superficiales tienen un buen pronóstico, aunque las recurrencias puedan ser un desafío y requieran ajustes en el tratamiento y la gestión de factores de riesgo (Mizgier et al., 2020; Rosati et al., 2020; Sun et al., 2023). Pacientes con condiciones como la diabetes deben ser monitorizados cuidadosamente, ya que están en mayor riesgo de recurrencias y complicaciones (Shahabudin et al., 2024).

1.2.2.1. Queratitis fúngica

La queratitis fúngica es una infección corneal grave que puede resultar en pérdida visual significativa si no se trata de manera oportuna. Si bien puede ser causada por *Candida*, otros hongos como *Fusarium* y *Aspergillus* también son comunes en esta infección (Donovan et al., 2022; Sharma et al., 2022). *Fusarium* y *Aspergillus*, son los principales patógenos en zonas tropicales (Niu et al., 2020; Sharma et al., 2022), mientras que en áreas más urbanizadas o en climas más templados, las levaduras como *Candida* son más comunes (Donovan et al., 2022; Sharma et al., 2022).

Esta patología es más prevalente en áreas tropicales y subtropicales, puesto que el clima cálido y húmedo es un factor determinante que favorece la proliferación de hongos en el medio ambiente. En regiones como el sur de Asia, África subsahariana y América Latina, la queratitis puede ser responsable de hasta el 50% de las infecciones corneales, especialmente en zonas rurales con alta actividad agrícola (Donovan et al., 2022; Sharma et al., 2022). Mientras que, en países desarrollados, a pesar de ser menos frecuente, la prevalencia está aumentando debido al uso extendido de lentes de contacto y al uso inadecuado de medicamentos tópicos como corticoides (Donovan et al., 2022; Sha et al., 2021).

Entre los factores de riesgo más importantes se encuentran:

- **Trauma corneal:** Las lesiones en la córnea, especialmente aquellas causadas por contacto con material vegetal, pueden facilitar la inoculación del hongo en la córnea, lo que facilita la inoculación del hongo en la córnea (Niu et al., 2020).
- **Uso de lentes de contacto:** Un factor cada vez más reconocido en países desarrollados (Donovan et al., 2022).
- **Enfermedades oculares preexistentes:** Se incluyen las queratopatías previas y el uso prolongado de corticoides tópicos o sistémicos (Niu et al., 2020; Sharma et al., 2022).
- **Inmunosupresión:** Las personas con enfermedades sistémicas, como la diabetes o el VIH, presentan un mayor riesgo de desarrollar infecciones graves (Donovan et al., 2022; Sha et al., 2021; Sharma et al., 2022).

En comparación con las infecciones bacterianas, la queratitis fúngica tiende a evolucionar de manera más insidiosa. Los pacientes suelen experimentar síntomas como dolor ocular, fotofobia, lagrimeo y visión borrosa.

Tratamiento: Es prolongado y complejo, siendo los antifúngicos tópicos el enfoque habitual. Entre estos, el voriconazol y la natamicina son los más utilizados, mostrando buena eficacia contra levaduras y hongos filamentosos, respectivamente (Donovan et al., 2022; Sha et al., 2021). Sin embargo, la natamicina no está comercializada en España, por lo que su uso requiere autorización como medicamento extranjero conforme al Real Decreto 1015/2009,

que regula la disponibilidad de medicamentos en situaciones especiales. En casos de infecciones profundas o refractarias, puede ser necesario complementar con antifúngicos sistémicos, y en situaciones avanzadas, recurrir a intervenciones quirúrgicas, como la queratoplastia terapéutica o el trasplante de córnea (Niu et al., 2020; Sha et al., 2021; Sharma et al., 2022).

1.2.2.2. Candidiasis oral

La candidiasis oral es una infección fúngica oportunista causada, en la mayoría de los casos, por un sobrecrecimiento de *C. albicans* en la mucosa oral. Aunque puede manifestarse en personas sanas, suele afectar principalmente a aquellas con sistemas inmunitarios comprometidos o con alteraciones locales en la cavidad oral (Jørgensen, 2024; Millsop & Fazel, 2016; Vila et al., 2020).

La prevalencia depende de factores como la edad, el estado del sistema inmunológico y la presencia de otras enfermedades. Se estima que hasta el 60% de los adultos sanos tienen *Candida* como parte de su microbiota oral, aunque solo se vuelve patógena bajo ciertas condiciones (Vila et al., 2020). La candidiasis oral es más común en neonatos, ancianos, personas con VIH/SIDA y pacientes inmunocomprometidos o que están bajo tratamientos prolongados con corticosteroides o antibióticos (Jørgensen, 2024; Vila et al., 2020). En pacientes con cáncer que reciben quimioterapia, radioterapia o inmunosupresores, la prevalencia de la candidiasis oral es especialmente alta, con tasas de infección que pueden superar el 50% (Contaldo et al., 2023).

Los factores de riesgo más comunes incluyen (Jørgensen, 2024; Vila et al., 2020):

- **Inmunosupresión.**
- **Alteraciones locales en la cavidad oral:** Uso de prótesis dentales mal ajustadas, xerostomía o malas prácticas de higiene bucal.
- **Terapias prolongadas con antibióticos o corticoesteroides:** La microbiota oral se puede ver alterada y predisponer al crecimiento excesivo de *Candida*.
- **Enfermedades crónicas:** Como la diabetes mellitus y las autoinmunes.
- **Edad avanzada o neonatal:** Por presentar un sistema inmunológico menos eficiente.

La candidiasis oral puede presentarse bajo diversas formas clínicas, cada una con características propias que dependen de la condición del paciente y de los factores predisponentes. La forma más común es la candidiasis pseudomembranosa, también conocida como “muguet”. Esta variante se caracteriza por la aparición de placas blancas y cremosas en la mucosa bucal, que al rasparse pueden dejar una superficie eritematosa, dolorosa y, en algunos casos, sangrante (Millsop & Fazel, 2016; Vila et al., 2020). Otra forma frecuente es la candidiasis eritematosa, que se presenta con áreas enrojecidas y dolorosas,

generalmente localizadas en el paladar o la lengua. Es más común en pacientes que utilizan prótesis dentales mal ajustadas o en quienes han sido tratados con antibióticos o corticosteroides (Millsop & Fazel, 2016; Vila et al., 2020). La candidiasis hiperplásica crónica, es una forma menos frecuente de la infección que se caracteriza por la aparición de placas blancas que no se desprenden al rasparse. Es más persistente que otras variantes. Este tipo suele estar relacionado con factores locales irritantes y, en algunos casos, se asocia con el consumo de tabaco (Vila et al., 2020). Por último, la queilitis angular se presenta como fisuras o lesiones eritematosas en las comisuras de los labios. Esta forma de candidiasis se asocia frecuentemente con deficiencias nutricionales, como la falta de hierro o vitamina B12, así como con el uso de prótesis dentales mal ajustadas que propician la acumulación de saliva y favorecen el sobrecrecimiento de *Candida* en esa zona (Millsop & Fazel, 2016).

En el contexto de la candidiasis oral, la mucositis puede desempeñar un papel importante. Esta condición se define como la inflamación de las mucosas y es frecuentemente observada en pacientes que reciben tratamientos oncológicos como la quimioterapia y la radioterapia. Además de por la inflamación, también se caracteriza por enrojecimiento y ulceraciones de la mucosa oral. La mucositis puede dañar la barrera protectora de la mucosa, haciendo que el entorno sea más propenso a la predisposición y exacerbación de la infección (Jørgensen, 2024; Vila et al., 2020). La inflamación y el deterioro de la mucosa bucal pueden facilitar la adhesión de *Candida* a las superficies de la cavidad oral, lo que aumenta la extensión y gravedad de la candidiasis oral. Esto puede transformar una infección relativamente simple en una más severa y difusa, requiriendo atención especializada para el manejo efectivo de ambas condiciones (Contaldo et al., 2023; Vila et al., 2020).

Tratamiento: El tratamiento de la candidiasis oral se basa en la eliminación de los factores predisponentes y el uso de antifúngicos. Las opciones terapéuticas incluyen antifúngicos tópicos, como nistatina o clotrimazol, recomendados en casos leves, y antifúngicos sistémicos, como fluconazol o itraconazol, indicados en infecciones graves o recurrentes, o en pacientes inmunodeprimidos (Contaldo et al., 2023; Jørgensen, 2024). Además, nuevas estrategias terapéuticas incluyen el uso de fitoterapia y probióticos para regular la microbiota oral, así como la terapia fotodinámica, que ha mostrado ser eficaz en estudios recientes (Contaldo et al., 2023).

1.2.2.3. Candidiasis vulvovaginales

La candidiasis vulvovaginal es una de las infecciones genitales más frecuentes en mujeres en edad reproductiva. En el 85-95% de los casos, es provocada principalmente por el hongo *C. albicans* (Jafarzadeh et al., 2022). Se estima que el 75% de las mujeres experimentará al menos un episodio de esta infección a lo largo de su vida, y en torno al 40 o 50% de ellas sufrirán recurrencias (Nyirjesy et al., 2022). La forma recurrente de la

enfermedad, definida como cuatro o más episodios en un año, afecta aproximadamente al 8-10% de las mujeres, lo que representa un desafío importante para el manejo clínico (Rosati et al., 2020).

Diversos factores de riesgo están asociados con el desarrollo. Los principales incluyen:

- **Uso prolongado de antibióticos:** La microbiota vaginal se puede ver alterada y favorecer la proliferación de *Candida* (Sun et al., 2023).
- **Cambios hormonales:** Como los que ocurren durante el embarazo o con el uso de anticonceptivos hormonales (Jafarzadeh et al., 2022; Sun et al., 2023).
- **Diabetes mellitus** (Jafarzadeh et al., 2022; Sun et al., 2023).
- **Hábitos dietéticos:** Como el consumo elevado de azúcares (Mizgier et al., 2020).
- **Estilo de vida:** Uso de ropa ajustada y la falta de ventilación genital (Mizgier et al., 2020).

La disbiosis de la microbiota vaginal desempeña un papel crucial en el desarrollo de esta infección, ya que el desequilibrio en la microbiota vaginal puede permitir la sobreproliferación de *Candida* (Sun et al., 2023). La recurrencia de la candidiasis vulvovaginal ha sido vinculada a deficiencias en la respuesta inmunológica local, lo que sugiere que el sistema inmunitario tiene un papel clave en la susceptibilidad y el control de la misma (Rosati et al., 2020).

Los síntomas más comunes incluyen prurito intenso, ardor vaginal, disuria y una secreción vaginal espesa, blanca y sin olor, que recuerda a "requesón". En ocasiones, la inflamación puede provocar enrojecimiento y dolor en la vulva y la vagina. Aunque los síntomas suelen ser molestos, pueden variar en severidad, y algunas mujeres experimentan síntomas leves que pueden pasar desapercibidos (Jafarzadeh et al., 2022).

Tratamiento: El tratamiento generalmente incluye el uso de antifúngicos, como clotrimazol, miconazol y fluconazol, que pueden ser administrados por vía tópica o sistémica, dependiendo de la severidad del cuadro clínico (Nyirjesy et al., 2022). Para infecciones leves y moderadas, una sola dosis de fluconazol oral o tratamientos tópicos breves son eficaces. No obstante, en casos de recurrencia, se requiere un tratamiento prolongado. Las guías actuales sugieren tomar 150 mg de fluconazol una vez por semana durante al menos seis meses para prevenir nuevas recurrencias (Nyirjesy et al., 2022). Además, el uso de probióticos ha sido propuesto como una estrategia preventiva y complementaria, con el objetivo de restaurar la microbiota vaginal y reducir el riesgo de recurrencias. Aunque los estudios han mostrado resultados prometedores, aún se necesitan más investigaciones para confirmar su eficacia definitiva (Mizgier et al., 2020; Sun et al., 2023).

1.2.2.4. Candidiasis cutáneas

La candidiasis cutánea, aunque suele presentarse como una infección superficial, en algunos casos puede evolucionar a formas más severas y sistémicas, especialmente en personas con factores predisponentes (Lu et al., 2023). Es una condición frecuente que afecta tanto a individuos inmunocompetentes como inmunodeprimidos. Es más prevalente en climas cálidos y húmedos, donde la humedad en los pliegues cutáneos favorece el crecimiento del hongo. De todas las especies de *Candida*, *C. albicans* es la que más involucrada está (Lu et al., 2023).

Los principales factores de riesgo para desarrollar candidiasis cutánea incluyen (Shahabudin et al., 2024):

- **Diabetes mellitus:** La hiperglucemia favorece el crecimiento de *Candida* en la piel y pliegues corporales.
- **Obesidad:** Incrementa la humedad en los pliegues cutáneos, favoreciendo el crecimiento del hongo.
- **Sudoración excesiva:** Proporciona un ambiente húmedo que facilita la proliferación de *Candida*.
- **Uso prolongado de antibióticos y corticoesteroides.**
- **Inmunosupresión.**

La candidiasis cutánea suele presentarse como lesiones eritematosas, maculopapulares o pústulas en áreas húmedas y oclusivas del cuerpo, como los pliegues inguinales, axilas y debajo de los senos. Las lesiones pueden ir acompañadas de prurito intenso, dolor y descamación. En algunos casos, puede evolucionar a fisuras y erosiones en la piel. La presentación clínica en pacientes con diabetes puede ser más severa y prolongada debido a la mayor susceptibilidad a la infección (Shahabudin et al., 2024).

Tratamiento: Varía según la severidad de la infección. Para infecciones leves, los antifúngicos tópicos como clotrimazol, miconazol o nistatina son efectivos y se consideran la primera opción (Taudorf et al., 2019). En casos de infecciones más extensas o recurrentes, puede ser necesario utilizar antifúngicos sistémicos, como el fluconazol. Además, es fundamental abordar los factores subyacentes, como el control de la glucemia en pacientes diabéticos o la reducción de la humedad en las áreas afectadas. Investigaciones recientes sugieren la posibilidad de terapias dirigidas y tratamientos más específicos, como la inhibición de mecanismos moleculares que facilitan la adhesión y proliferación de *Candida* en la piel. Estas estrategias emergentes ofrecen un enfoque más avanzado para el manejo de la infección (Lu et al., 2023).

1.2.3. Candidiasis invasivas

La candidiasis invasiva es una de las infecciones fúngicas más comunes y graves en entornos hospitalarios, particularmente en UCI. La incidencia global ha aumentado en las últimas décadas, reflejando tanto el aumento de la población de alto riesgo, como los paciente inmunocomprometidos, como la mejoría en las técnicas de diagnóstico (McCarty et al., 2021). El agente etiológico predominante es *C. albicans*, representando alrededor del 40 al 60% de los casos. Sin embargo, la prevalencia de las especies no *albicans* ha ido en aumento y presentan una menor susceptibilidad a los antifúngicos, además de estar asociadas con brotes en hospitales de todo el mundo (Gonzalez-Lara & Ostrosky-Zeichner, 2020; Lass-Flörl et al., 2024).

La patogénesis de la candidiasis invasiva es un proceso complejo que implica una interacción entre la virulencia del hongo y las defensas inmunitarias del huésped. En situaciones donde la barrera mucosa o la piel están dañadas, o cuando el sistema inmunológico está comprometido, *Candida* puede invadir los tejidos subyacentes y diseminarse a través del torrente sanguíneo (McCarty et al., 2021).

1.2.3.1. Candidiasis oculares

La candidiasis ocular es una complicación oftalmológica derivada de la infección sistémica por *C. albicans*, principalmente. Aunque es una manifestación poco frecuente, representa un riesgo significativo de morbilidad en pacientes con candidemia. La visión se puede ver comprometida si no es diagnosticada y tratada adecuadamente (Phongkhun et al., 2023; Sakamoto et al., 2022).

La prevalencia en pacientes con candidemia se sitúa entre el 3.4% y el 16.3%, variando según el contexto geográfico y las características de la población estudiada. Dentro de estos casos, la endoftalmitis representa la manifestación más grave, aunque menos común, abarcando entre el 2% y el 4% de los casos (Phongkhun et al., 2023).

Entre los principales factores de riesgo asociados al desarrollo de la candidiasis ocular se incluyen (Sakamoto et al., 2022):

- **Inmunosupresión:** Pacientes con enfermedades inmunodeficientes, como el VIH/SIDA, aquellos que reciben tratamiento con inmunosupresores o quimioterapia.
- **Uso prolongado de antibióticos o corticoides:** Los tratamientos con antibióticos de amplio espectro pueden alterar el equilibrio de la microbiota, favoreciendo el crecimiento excesivo de *Candida*.
- **Cirugías oculares recientes:** Procedimientos invasivos que pueden facilitar la entrada del hongo al ojo.

- **Diabetes mellitus:** Esta condición predispone a los pacientes a infecciones micóticas, debido a un entorno más favorable para el crecimiento de hongos.

En pacientes que desarrollan endoftalmitis por *Candida*, también se ha observado una asociación con el uso de catéteres venosos centrales y la nutrición parenteral prolongada (Sakamoto et al., 2022). Los pacientes con este tipo de infección pueden presentar diversas manifestaciones, que van desde la retinitis por *Candida*, afectando la retina y el humor vítreo, hasta la endoftalmitis severa, infección intraocular profunda que puede comprometer gravemente la visión. Los síntomas más comunes incluyen visión borrosa, dolor ocular, fotofobia, y enrojecimiento y sensibilidad en el ojo (Phongkhun et al., 2023). El desarrollo de estas manifestaciones puede ser insidioso, dificultando un diagnóstico temprano. Además, los pacientes pueden ser asintomáticos en las primeras etapas de la infección (Sakai et al., 2021).

Tratamiento: El manejo de esta infección implica la administración de terapia antifúngica sistémica, complementada en ciertos casos con opciones tópicas o intraoculares. Los medicamentos más empleados son fluconazol, voriconazol y anfotericina B. En las formas más severas de endoftalmitis, es posible que se requiera una vitrectomía, una intervención quirúrgica para eliminar el humor vítreo infectado (Sakamoto et al., 2022). La elección de antifúngicos es crucial en el tratamiento. Aunque las equinocandinas, como la caspofungina (CSP) y micafungina, tienen una penetración ocular limitada, estudios recientes indican que pueden ser efectivas para tratar la candidemia sin endoftalmitis (Sakai et al., 2021).

El pronóstico depende en gran medida de su detección temprana y manejo adecuado. Si la infección no se trata, puede llevar a complicaciones graves, incluida la pérdida permanente de la visión. La endoftalmitis, en particular, es una forma grave que conlleva un alto riesgo de ceguera si no se trata de forma agresiva. Estudios han mostrado que la efectividad del tratamiento puede variar y que, en numerosos casos, es posible que persistan secuelas visuales significativas (Phongkhun et al., 2023).

1.2.3.2. Otras formas de candidiasis invasiva

Además de la candidiasis ocular, las infecciones invasivas por *Candida* incluyen diversas manifestaciones clínicas que afectan a distintos órganos y sistemas, siendo la candidemia la más común. Otras formas incluyen la esofagitis, la peritonitis, las infecciones osteoarticulares, cardiovasculares, del sistema nervioso central, urinarias y la candidiasis crónica diseminada (Cervera, 2012).

La **candidemia** implica la presencia de *Candida* en el torrente sanguíneo. Es una de las infecciones fúngicas más graves y frecuentes en pacientes hospitalizados,

especialmente en las UCI. Esta condición está asociada a factores como el uso prolongado de catéteres venosos centrales, la nutrición parenteral, el tratamiento antibiótico de amplio espectro y las enfermedades inmunosupresoras. Los síntomas son inespecíficos e incluyen fiebre persistente, refractaria a tratamiento antibacteriano, y signos de infección sistémica. El diagnóstico requiere hemocultivos positivos o biomarcadores específicos. Las equinocandinas son el tratamiento de elección inicial, con transición a otros antifúngicos según susceptibilidad y estabilidad clínica del paciente (Gonzalez-Lara & Ostrosky-Zeichner, 2020; McCarty et al., 2021).

La **esofagitis por *Candida*** es frecuente en pacientes inmunocomprometidos, causando disfagia y odinofagia. La **peritonitis candidiásica**, habitual tras diálisis o cirugías abdominales, puede evolucionar hacia sepsis. Las **infecciones osteoarticulares**, como la osteomielitis y la artritis séptica, son secundarias a diseminación hematógena o procedimientos quirúrgicos. En el sistema cardiovascular, la **endocarditis por *Candida*** afecta a pacientes con válvulas protésicas o dispositivos intravasculares. Las **infecciones del SNC**, aunque poco frecuentes, se presentan con fiebre, cefalea y alteración del estado mental. Por otro lado, las **candidurias** son comunes en pacientes con sondas urinarias prolongadas, mientras que la **candidiasis crónica diseminada** afecta a aquellos con neutropenia prolongada, manifestándose como lesiones hepatoesplénicas visibles en estudios de imagen (Cervera, 2012). El tratamiento depende de la localización y gravedad, siendo las equinocandinas, el fluconazol y la anfotericina B las opciones principales, ajustadas según las características del paciente y la sensibilidad del patógeno (Cervera, 2012).

1.3. Fármacos antifúngicos

Los agentes antifúngicos son cruciales en el tratamiento de infecciones micóticas, ya que interfieren con diversos componentes de la célula fúngica para inhibir su crecimiento o destruirla. A diferencia de las bacterias, los hongos presentan un desafío terapéutico significativo como es la identificación de dianas selectivas que no dañen las células humanas. En este contexto, los antifúngicos se dirigen a componentes específicos que son exclusivos o de mayor relevancia en las células fúngicas (Quiles-Melero & García-Rodríguez, 2021). De acuerdo con la clasificación anatómica-terapéutica-química (ATC), estos medicamentos se agrupan generalmente bajo la letra J de antiinfecciosos cuando se administran de manera sistémica. No obstante, si se utilizan para tratar infecciones dermatológicas, pueden estar incluidos en el grupo anatómico D.

El mecanismo de acción de los antifúngicos se basa en la interferencia con componentes esenciales para la estructura o el metabolismo del hongo (Figura 4), dividiéndose en tres grandes grupos según el sitio de acción (Tabla 3). En primer lugar, los antifúngicos que alteran la membrana celular incluyen los **polienos**, que se unen al

ergosterol, un lípido fundamental en la membrana fúngica, provocando su desestabilización. En segundo lugar, los antifúngicos que interfieren en la síntesis de la membrana fúngica incluyen los **azoles**, que inhiben la producción de ergosterol. Finalmente, las **equinocandinas** son antifúngicos que afectan la pared celular, bloqueando la síntesis de 1,3- β -D-glucano, un polisacárido crucial para la integridad de la pared celular. Además, otros fármacos como la 5-fluorocitosina interfieren en la síntesis de ARN y ADN, ampliando las opciones terapéuticas (Quiles-Melero & García-Rodríguez, 2021).

Entre otros tipos de antifúngicos, encontramos a los **alílicos** y las **pirimidinas**. Los alílicos, como la terbinafina, inhiben la síntesis de ergosterol al interferir con la enzima escualeno epoxidasa. Por otro lado, las pirimidinas, como la 5-fluorocitosina, interfieren en la síntesis de ADN y ARN al inhibir la timidina sintasa.

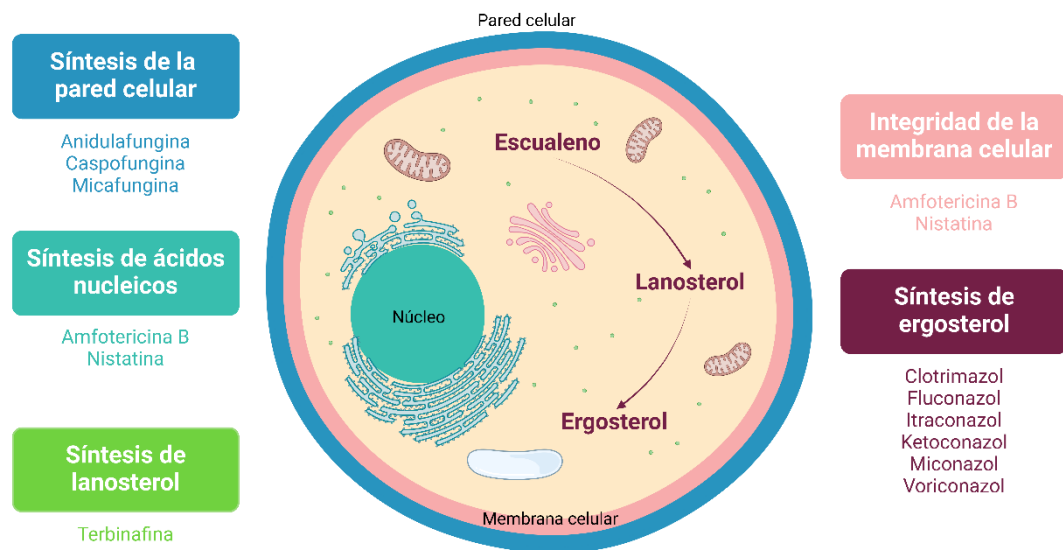


Figura 4. Clasificación de antifúngicos según el mecanismo de acción basado en la interferencia con componentes esenciales para la estructura o el metabolismo del hongo.

Tabla 3. Clasificación de agentes antifúngicos e indicación terapéutica.

Grupo	Mecanismo acción	Nombre genérico	Indicación
Polienos	Alteran la permeabilidad de la membrana celular por unión al ergosterol	<i>Anfotericina B</i>	Infecciones severas y sistémicas.
		<i>Nistatina</i>	Candidiasis mucocutáneas e intestinales
Imidazoles	Inhiben la síntesis de ergosterol	<i>Clotrimazol</i>	Candidiasis vulvovaginal e infecciones fúngicas superficiales por hongos y levaduras sensibles
		<i>Ketoconazol</i>	Infecciones fúngicas superficiales de la piel
		<i>Miconazol</i>	Infecciones fúngicas mucocutáneas
Azoles	Inhiben la síntesis de ergosterol	<i>Fluconazol</i>	Candidiasis invasivas y mucocutáneas
		<i>Itraconazol</i>	Onicomycosis, aspergilosis y candidiasis sistémicas y en mucosas
		<i>Posaconazol</i>	Infecciones fúngicas invasivas, como aspergilosis y fusariosis
		<i>Voriconazol</i>	Infecciones graves por <i>Candida</i> , <i>Scedosporium</i> y <i>Fusarium</i> . Aspergilosis invasiva
Equinocandinas	Inhiben la síntesis de 1,3- β -D-glucano	<i>Caspofungina</i>	Infecciones invasivas, como candidiasis y aspergilosis
		<i>Micafungina</i>	Candidiasis invasivas
		<i>Anidulafungina</i>	Infecciones fúngicas invasiva
Otros	Alílicos	<i>Terbinafina</i>	Infecciones fúngicas de la piel, cuero cabelludo y uñas
	Pirimidinas	<i>5-Fluorocitosina</i>	En combinación con otros para infecciones fúngicas graves

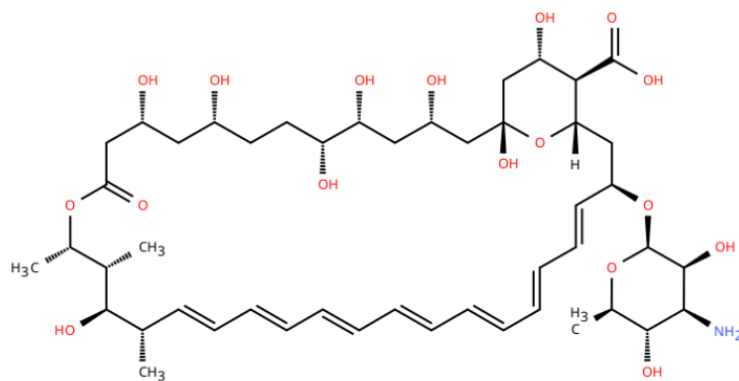
A pesar de su importancia, el uso clínico de estos fármacos puede verse restringido. Algunos hongos presentan resistencia intrínseca a ciertos agentes, limitando la eficacia del tratamiento desde el inicio. Además, la resistencia secundaria puede desarrollarse con el tiempo, especialmente tras tratamientos prolongados, dificultando la erradicación de la infección. La toxicidad de ciertos antifúngicos puede restringir su aplicación en algunos pacientes, y el alto coste de estos medicamentos puede representar una barrera considerable para su accesibilidad y uso extendido.

1.3.1. Polienos o macrólidos poliénicos

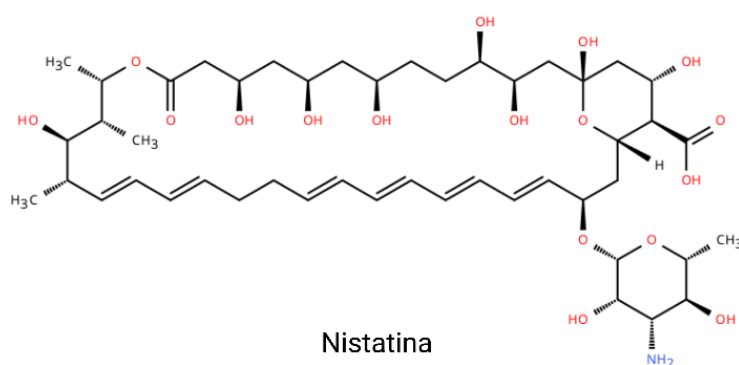
Los polienos son macrólidos caracterizados por tener cadenas insaturadas y una estructura anfifílica, lo que les confiere baja solubilidad en agua y baja biodisponibilidad por vía digestiva (S. C. A. Chen & Sorrell, 2007). Como se ha comentado anteriormente, su mecanismo de acción se basa en la afinidad por los esteroides de la membrana fúngica, especialmente por el ergosterol. Esta unión genera la formación de poros o canales que alteran la permeabilidad de la membrana, permitiendo la salida de contenido citoplasmático. Como consecuencia, se produce en la célula fúngica daños oxidativos que finalmente conducen a su muerte (S. C. A. Chen & Sorrell, 2007). Debido a este mecanismo, los polienos son fundamentales en el tratamiento de infecciones fúngicas graves (Bhattacharya et al., 2020).

El fármaco más conocido y utilizado de este grupo es la **anfotericina B** (Figura 5), un potente antifúngico que se utiliza en el tratamiento de infecciones fúngicas sistémicas graves, como la aspergilosis invasiva, la criptococosis y la candidiasis diseminada (Bhattacharya et al., 2020; S. C. A. Chen & Sorrell, 2007). A pesar de su eficacia, la anfotericina B tiene un perfil de toxicidad elevado, destacando su nefrotoxicidad, lo que puede limitar su uso o requerir un manejo cuidadoso en pacientes con insuficiencia renal (S. C. A. Chen & Sorrell, 2007; Quiles-Melero & García-Rodríguez, 2021).

Otro polieno ampliamente utilizado es la **nistatina** (Figura 5), que se emplea principalmente para tratar infecciones fúngicas superficiales causadas por *Candida*, como la candidiasis oral, esofágica y vaginal (Quiles-Melero & García-Rodríguez, 2021). A diferencia de la anfotericina B, la nistatina no se absorbe bien a nivel sistémico, por lo que su uso se limita a aplicaciones tópicas o locales, lo que reduce significativamente el riesgo de efectos secundarios sistémicos (S. C. A. Chen & Sorrell, 2007; Quiles-Melero & García-Rodríguez, 2021). Un tercer agente del grupo es la natamicina, que se utiliza tanto en el ámbito médico como en la industria alimentaria. En medicina, se usa principalmente en el tratamiento de infecciones oculares fúngicas, mientras que en la industria alimentaria actúa como un conservante natural debido a su capacidad para inhibir el crecimiento de hongos y levaduras en diversos productos (S. C. A. Chen & Sorrell, 2007).



Anfotericina B



Nistatina

Figura 5. Estructura química de los polienos.

Aunque los polienos son eficaces contra una amplia gama de hongos, tienen algunas limitaciones. Su toxicidad, en particular, la de la anfotericina B, ha llevado al desarrollo de formulaciones liposomales o en complejo lipídico, que mejoran su perfil de seguridad al reducir la nefrotoxicidad sin comprometer la eficacia antifúngica. Estas formulaciones ofrecen una mejor opción para los pacientes que requieren tratamiento prolongado o que presentan comorbilidades que aumentan el riesgo de toxicidad renal (Quiles-Melero & García-Rodríguez, 2021).

1.3.2. Azoles

Los azoles son compuestos sintéticos que contienen un anillo heterocíclico unido a una cadena alifática con un grupo fenilo. Dependiendo del número de átomos de nitrógeno en el anillo azólico, se dividen en dos categorías: los imidazoles, con dos átomos de nitrógeno y los triazoles, con tres átomos de nitrógeno. Estos antifúngicos interfieren en la síntesis del ergosterol al inhibir la enzima C14- α esterol desmetilasa. La inhibición de esta vía provoca la acumulación de esteroides tóxicos y una reducción del ergosterol, lo que compromete la integridad de la membrana celular y detiene el crecimiento de las células fúngicas (S. C. A. Chen & Sorrell, 2007; Nocua-Báez et al., 2020).

- Imidazoles

Entre los imidazoles, el **clotrimazol** y el **ketoconazol** (Fig. 6) se utilizan comúnmente para tratar infecciones fúngicas superficiales, como la candidiasis oral y vaginal. Son efectivos contra levaduras, dermatofitos y hongos dimorfos endémicos. Sin embargo, presentan mayor toxicidad cuando se administran sistemáticamente debido a su afinidad por ciertas enzimas humanas (Nocua-Báez et al., 2020).

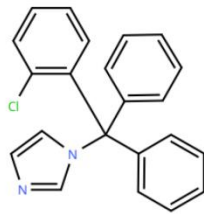
El clotrimazol se emplea principalmente en formulaciones tópicas debido a su perfil de seguridad favorable y a su acción localizada, lo que lo hace adecuado para infecciones mucocutáneas sin comprometer la absorción sistémica (Nocua-Báez et al., 2020). Por su parte, el ketoconazol presenta un amplio espectro de acción y, aunque fue uno de los primeros antifúngicos orales en el tratamiento de infecciones graves, su uso sistémico fue suspendido en la Unión Europea tras la recomendación del Comité de Medicamentos de Uso Humano de la Agencia Europea de Medicamentos debido al riesgo de hepatotoxicidad. En España, no existen formulaciones orales de ketoconazol comercializadas para uso en humanos. A pesar de estas limitaciones, el ketoconazol sigue siendo valioso en formulaciones tópicas para el tratamiento de infecciones superficiales como dermatofitosis y dermatitis seborreica, donde es efectivo y seguro con una baja absorción sistémica (Nocua-Báez et al., 2020).

- Triazoles

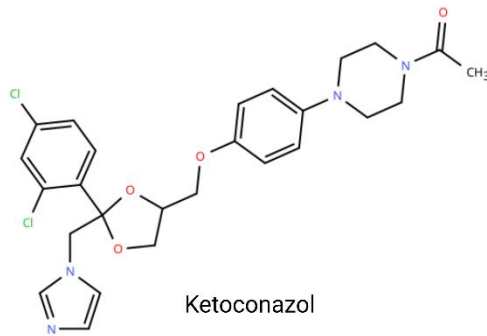
Los triazoles, entre los que destacan **fluconazol**, **itraconazol**, **voriconazol** y **posaconazol** (Figura 6), son eficaces contra infecciones fúngicas sistémicas más severas, incluyendo la aspergilosis invasiva, la criptococosis y la candidiasis diseminada. Tienen una mayor afinidad por las membranas de las células fúngicas y son menos tóxicos (S. C. A. Chen & Sorrell, 2007; Nocua-Báez et al., 2020).

El fluconazol es uno de los más utilizados gracias a su excelente biodisponibilidad oral y un perfil de seguridad relativamente favorable. Se emplea en el tratamiento de infecciones causadas por *Candida* y *Cryptococcus*, siendo especialmente útil en pacientes inmunocomprometidos (S. C. A. Chen & Sorrell, 2007). No obstante, el uso prolongado puede favorecer la aparición de resistencias, lo que puede reducir su eficacia en ciertos casos (Bhattacharya et al., 2020). Por su parte, el itraconazol presenta un espectro de acción más amplio, siendo eficaz contra hongos dimórficos y *Aspergillus*. Sin embargo, su absorción puede verse afectada por factores como la acidez gástrica, lo que hace necesario un ajuste cuidadoso de la dosificación (Nocua-Báez et al., 2020). Los triazoles de segunda generación, como el voriconazol y el posaconazol, ofrecen una mayor eficacia contra *Aspergillus* y otros hongos que muestran resistencia a los azoles de primera generación. El voriconazol es el tratamiento de primera línea para la aspergilosis invasiva, mientras que el posaconazol se utiliza tanto en el tratamiento como en la profilaxis de infecciones fúngicas en pacientes de alto riesgo (Nocua-Báez et al., 2020; Quiles-Melero & García-Rodríguez, 2021).

IMIDAZOLES

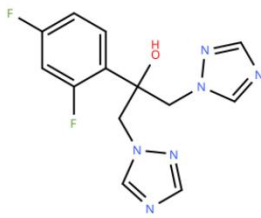


Clotrimazol

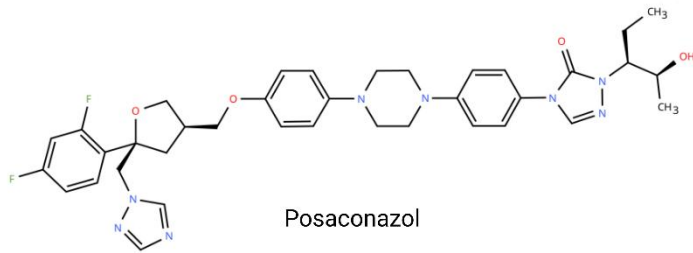


Ketoconazol

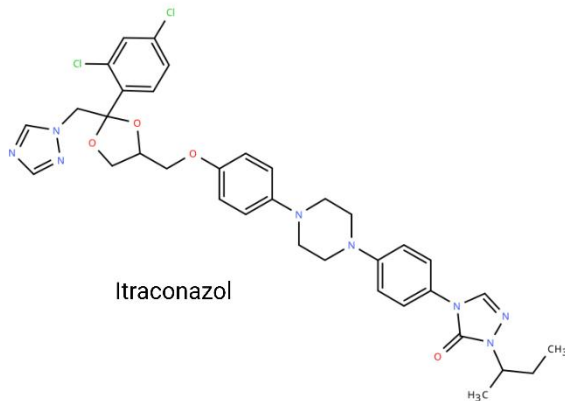
TRIAZOLES



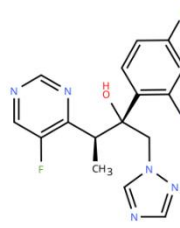
Fluconazol



Posaconazol



Itraconazol



Voriconazol

Figura 6. Estructura química de los azoles.

A pesar de su efectividad, los azoles pueden causar diversos efectos secundarios, siendo la hepatotoxicidad uno de los más destacados. Esta puede presentarse con un aumento de las enzimas hepáticas y, en casos graves, con daño hepático clínicamente significativo. Las alteraciones gastrointestinales, como náuseas, vómitos y dolor abdominal, también son relativamente comunes y pueden afectar la tolerancia al tratamiento en algunos pacientes (S. C. A. Chen & Sorrell, 2007). Además, los azoles son metabolizados principalmente por el sistema del citocromo P450, una familia de enzimas hepáticas responsable del metabolismo de una amplia gama de medicamentos. Esto aumenta el riesgo de interacciones farmacológicas, ya que los azoles pueden inhibir o inducir estas enzimas, alterando los niveles plasmáticos de otros fármacos (S. C. A. Chen & Sorrell, 2007). Por lo tanto, es necesario una monitorización cuidadosa en pacientes que toman varios medicamentos, ya que las interacciones pueden aumentar el riesgo de

toxicidad o reducir la eficacia de los tratamientos concomitantes (S. C. A. Chen & Sorrell, 2007; Quiles-Melero & García-Rodríguez, 2021).

1.3.3. Equinocandinas

Las equinocandinas representan la clase más novedosa de antifúngicos, destacándose por su notable eficacia en el tratamiento de infecciones fúngicas invasivas. Su mecanismo de acción consiste en inhibir la síntesis de 1,3-β-D-glucano, un polisacárido crucial para mantener la integridad de la pared celular de los hongos (Patil & Majumdar, 2017; Szymański et al., 2022). Al interferir en esta síntesis, la estructura de la pared celular se debilita, provocando su lisis y, finalmente, la muerte de las células fúngicas. A diferencia de los azoles y los polienos, las equinocandinas se enfocan únicamente en la pared celular de los hongos, lo que disminuye considerablemente su toxicidad para las células humanas (Patil & Majumdar, 2017).

Entre las equinocandinas destacan: **caspofungina (CSP)**, **micalfungina** y **anidulafungina** (Figura 7), los cuales se emplean principalmente en el tratamiento de infecciones causadas por especies de *Candida* y *Aspergillus* (S. C. A. Chen & Sorrell, 2007; Patil & Majumdar, 2017). Estos fármacos son particularmente eficaces en la candidiasis invasiva, donde se consideran el tratamiento de elección, especialmente en pacientes gravemente enfermos o inmunocomprometidos (Patil & Majumdar, 2017). Asimismo, se emplean como tratamiento alternativo o complementario en casos de aspergilosis invasiva, especialmente en pacientes que no responden o no toleran otros antifúngicos. No obstante, su actividad es limitada frente a otros hongos, como *Cryptococcus* (S. C. A. Chen & Sorrell, 2007).

Recientemente, se ha aprobado **rezafungina** como nuevo fármaco de esta clase. Destaca por su largo tiempo de vida media y su potencial para ser administrada de forma semanal, lo que supone una ventaja significativa en términos de adherencia al tratamiento, especialmente en el manejo de candidiasis invasiva (Desnos-Ollivier & Lanternier, 2024). Su aprobación marca un avance prometedor en el tratamiento de infecciones fúngicas, proporcionando una opción adicional para pacientes que requieren terapias prolongadas.

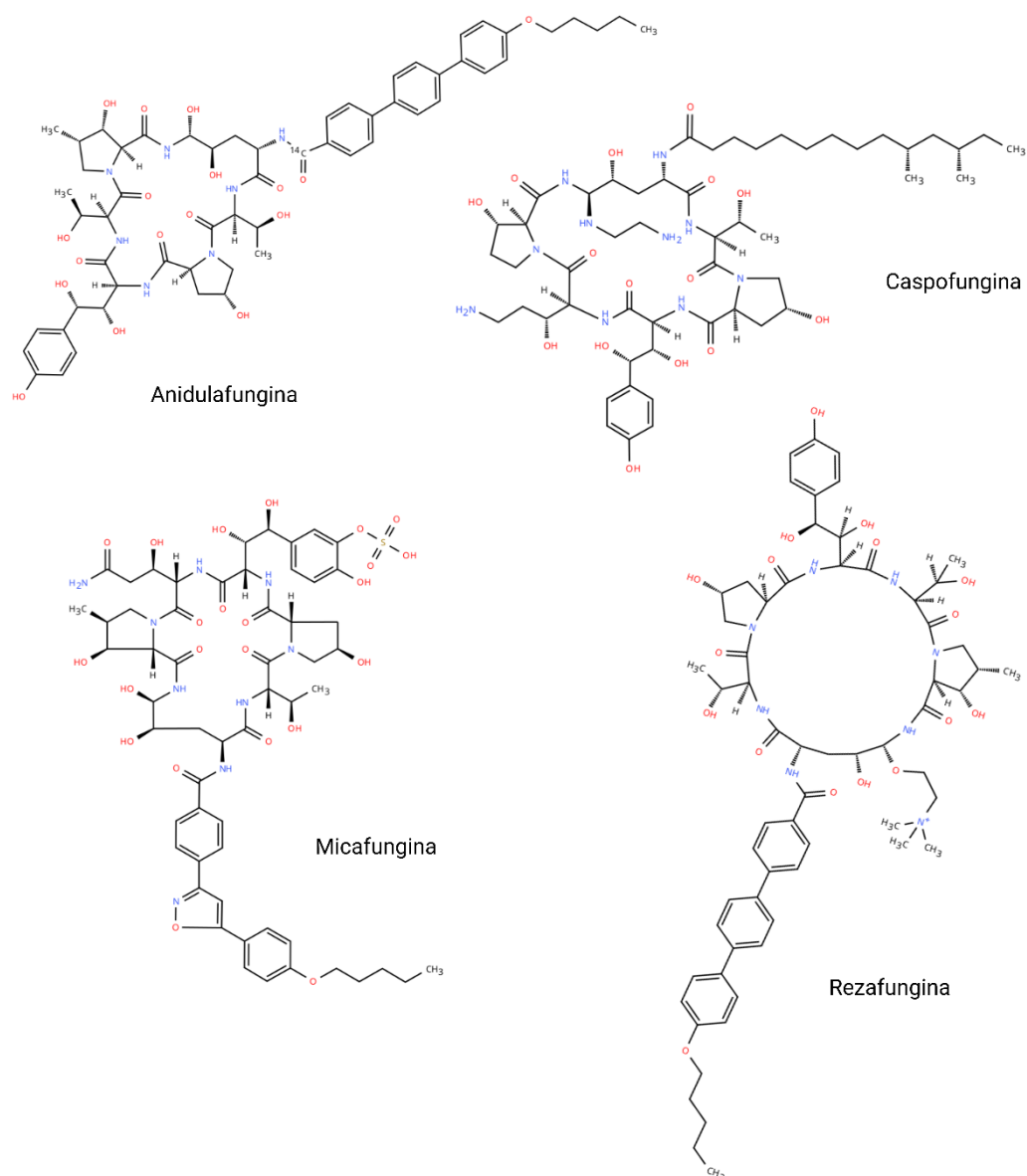


Figura 7. Estructura química de las equinocandinas.

Ventajas de este grupo

Una de las más notables es su bajo perfil de toxicidad, debido a su mecanismo de acción específico y a la menor incidencia de interacciones farmacológicas (Quiles-Melero & García-Rodríguez, 2021). No son metabolizadas principalmente por el sistema del citocromo P450, lo que reduce el riesgo de interacciones con otros medicamentos, haciéndolas una opción más segura para pacientes polimedicados o que requieren tratamientos prolongados (S. C. A. Chen & Sorrell, 2007; Quiles-Melero & García-Rodríguez, 2021). Además, su administración intravenosa garantiza una alta concentración plasmática, convirtiéndolas en una opción terapéutica ideal para infecciones fúngicas graves (S. C. A. Chen & Sorrell, 2007; Szymański et al., 2022).

Las equinocandinas son generalmente bien toleradas, presentando efectos secundarios leves como fiebre, flebitis en el lugar de la infusión y elevación temporal de las enzimas hepáticas. En raras ocasiones se han observado reacciones alérgicas (Quiles-Melero & García-Rodríguez, 2021). Gracias a su eficacia y perfil de seguridad favorable, las equinocandinas han ganado un lugar importante en el manejo de infecciones fúngicas invasivas, especialmente en situaciones donde otras terapias pueden ser menos efectivas o más tóxicas. Esto las convierte en una opción clave para el tratamiento de pacientes que presentan resistencia o efectos tóxicos derivados del uso de otras clases de antifúngicos (Patil & Majumdar, 2017; Quiles-Melero & García-Rodríguez, 2021).

1.3.3.1. Caspofungina

Derivada de compuestos naturales producidos por el hongo *Glarea lozoyensis*, la CSP fue fruto de décadas de investigación en la búsqueda de agentes que atacaran las estructuras esenciales de los hongos sin afectar a las células humanas (Szymański et al., 2022). Su desarrollo marcó un hito en la terapéutica antifúngica al ofrecer una nueva opción para combatir infecciones graves, como la candidiasis y aspergilosis, particularmente en pacientes inmunocomprometidos (Patil & Majumdar, 2017; Quiles-Melero & García-Rodríguez, 2021). La CSP fue el primer fármaco de su clase aprobado para el tratamiento de infecciones fúngicas invasivas, representando una alternativa a los antifúngicos tradicionales, como los azoles y los polienos, especialmente en casos de resistencia o intolerancia a estos fármacos (S. C. A. Chen & Sorrell, 2007; Quiles-Melero & García-Rodríguez, 2021).

1.3.3.1.1. Propiedades fisicoquímicas

La CSP es un lipopéptido semisintético de gran tamaño y peso molecular. Su estructura química está compuesta por un anillo cíclico de seis aminoácidos unido a una cadena lateral lipófila derivada de un ácido graso, lo que le otorga propiedades específicas esenciales para su actividad antifúngica (Patil & Majumdar, 2017; Szymański et al., 2022).

Su peso molecular aproximado es de 1.093,30 g/mol, lo que la convierte en una molécula relativamente grande con baja permeabilidad a través de membranas celulares humanas. Dada su estructura lipopéptida, la CSP presenta tanto propiedades hidrofílicas como lipofílicas, permitiéndole interactuar con la membrana celular de los hongos y unirse específicamente a la enzima 1,3- β -D-glucano sintasa (Szymański et al., 2022).

La solubilidad de la CSP en agua es limitada, lo que influye en su formulación farmacéutica. Hasta el momento, esto ha limitado su absorción oral y ha justificado su administración principalmente por vía intravenosa (Szymański et al., 2022). Para su uso clínico, se presenta en forma de acetato de CSP en polvo liofilizado, que debe ser

reconstituido con solución salina o agua estéril antes de su administración por vía intravenosa. Su solubilidad es mayor en soluciones acuosas a pH fisiológico, pero puede degradarse en condiciones extremas de pH, valores menores de 3 o mayores a 11 (Szymański et al., 2022).

En cuanto a su estabilidad térmica, debe ser almacenada a temperaturas entre 2-8 °C, protegida de la luz y la humedad para evitar su degradación. Una vez reconstituida, la solución es estable por un tiempo limitado a temperatura ambiente, dependiendo del solvente utilizado (Szymański et al., 2022).

1.3.3.1.2. Propiedades farmacológicas

Al inhibir específicamente la enzima 1,3-β-D-glucano sintasa, la integridad de la pared celular se ve comprometida, provocando la lisis y muerte del hongo. Este mecanismo destruye la estructura celular de especies como *Candida*, actuando como fungicida, mientras que en *Aspergillus* inhibe el crecimiento sin causar lisis inmediata, funcionando como fungistático (Patil & Majumdar, 2017; Szymański et al., 2022).

La CSP tiene una biodisponibilidad oral muy limitada (< 10%), por lo que su uso clínico es exclusivamente intravenoso. Se caracteriza por su elevada unión a proteínas plasmáticas y se distribuye ampliamente en órganos y tejidos, aunque apenas penetra en el líquido cefalorraquídeo y el humor vítreo (Patil & Majumdar, 2017; Szymański et al., 2022). Su actividad antifúngica depende de la concentración y, gracias a su perfil de seguridad y pocas interacciones farmacológicas, es el fármaco de primera elección para tratar y prevenir la candidiasis invasiva en pacientes con inmunodeficiencias o en estado crítico (Quiles-Melero & García-Rodríguez, 2021; Szymański et al., 2022).

1.3.3.1.3. Propiedades farmacocinéticas

Se une en un 96% a proteínas plasmáticas y tiene una semivida de eliminación que varía entre 9 y 14 horas, siendo metabolizada principalmente en el hígado a través de procesos de hidrólisis y N-acetilación. Su eliminación es mayoritariamente fecal, con una excreción renal mínima (Patil & Majumdar, 2017; Szymański et al., 2022). No requiere ajustes de dosis en función del sexo o la raza, ni en casos de insuficiencia renal. Sin embargo, en pacientes con insuficiencia hepática moderada se recomienda una reducción de la dosis de mantenimiento a 35 mg diarios (Patil & Majumdar, 2017; Quiles-Melero & García-Rodríguez, 2021).

1.3.3.1.4. Administración y posología

Se administra por vía intravenosa y la posología varía según la edad del paciente (Patil & Majumdar, 2017):

- En **adultos**, se recomienda administrar una dosis de carga inicial de 70 mg el primer día, seguida de 50 mg diarios a partir del día dos. Para pacientes con peso superior a 80 kg, la dosis de mantenimiento se incrementa a 70 mg diarios después de la dosis de carga.
- En **pacientes pediátricos**, de entre 12 meses y 17 años, la dosificación se basa en la superficie corporal (SC), calculada mediante la fórmula de Mosteller. En estos casos, se administra una dosis de carga de 70 mg/m² (sin exceder una dosis real de 70 mg) el primer día, seguida de 50 mg/m² diarios a partir del segundo día (sin exceder 70 mg diarios). Si esta dosis es bien tolerada pero no se obtiene una respuesta clínica adecuada, se puede aumentar a 70 mg/m² diarios, respetando siempre el límite máximo de 70 mg al día.

$$SC (m^2) = \sqrt{\frac{Altura (cm) \times Peso (kg)}{3600}}$$

- En **recién nacidos y lactantes menores de 12 meses**, la seguridad y eficacia de la caspofungina no han sido suficientemente evaluadas en ensayos clínicos. Sin embargo, los pocos datos disponibles sugieren que puede considerarse una dosis de 25 mg/m² diarios en recién nacidos y lactantes menores de 3 meses, y 50 mg/m² diarios en niños de entre 3 y 11 meses. Se recomienda precaución al tratar a este grupo de edad debido a la falta de información.

1.3.3.1.5. Indicación terapéutica

De acuerdo con la ficha técnica de los medicamentos comercializados que contienen CSP, publicada por la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS), la CSP está indicada para el tratamiento de la candidiasis invasora en pacientes adultos y pediátricos. También se utiliza en el manejo de la aspergilosis invasora en pacientes que son refractarios o intolerantes a otros antifúngicos, como la anfotericina B, sus formulaciones lipídicas y/o el itraconazol. En este contexto, la resistencia se define como la progresión de la enfermedad o la falta de mejoría clínica después de un mínimo de 7 días de terapia antifúngica efectiva previa (S. C. A. Chen & Sorrell, 2007; Quiles-Melero & García-Rodríguez, 2021). Además, es una opción terapéutica para el tratamiento empírico de infecciones fúngicas presuntas, como las causadas por *Candida* o *Aspergillus*, en pacientes adultos o pediátricos con fiebre persistente asociada a neutropenia. Este enfoque empírico es particularmente relevante en pacientes inmunocomprometidos debido a la alta mortalidad asociada a infecciones fúngicas invasoras (S. C. A. Chen & Sorrell, 2007).

La siguiente tabla muestra la sensibilidad de distintas especies de *Candida* a los antifúngicos más utilizados, destacando la eficacia de la CSP en estos casos.

Tabla 4. Sensibilidad de los principales antifúngicos sistémicos frente a diferentes especies de *Candida*.

<i>Candida</i> spp.	Fluconazol	Itraconazol	Voriconazol	Anfotericina B	Caspofungina
<i>C. albicans</i>	+++	+++	+++	+++	+++
<i>C. glabrata</i>	+/-	+/-	+++	++	+++
<i>C. parapsilosis</i>	+++	+++	+++	+++	++
<i>C. tropicalis</i>	++	+	++	+++	+++
<i>C. krusei</i>	-	+/-	+++	++	+++
<i>C. lusitaniae</i>	+++	+++	+++	-	+++

+ = Sensible; - = Resistente; +/- = Sensibilidad variable

1.3.3.1.6. Efectos adversos

De los medicamentos comercializados, los efectos secundarios son, en su mayoría, leves o moderados. Entre los más frecuentes se encuentran las elevaciones de enzimas hepáticas, como ALT, AST y fosfatasa alcalina, así como náuseas, vómitos, diarrea, fiebre, cefalea y reacciones locales en el sitio de perfusión, como eritema, prurito y flebitis (Quiles-Melero & García-Rodríguez, 2021; Szymański et al., 2022). Entre las reacciones menos frecuentes destacan las erupciones cutáneas, urticaria, hipotensión, disnea, mialgia y dolor abdominal.

En casos raros, puede causar hipersensibilidad severa, incluyendo anafilaxia, angioedema, síndrome de Stevens-Johnson y necrólisis epidérmica tóxica. Además, se han observado alteraciones hematológicas como anemia, trombocitopenia y leucopenia, así como anomalías metabólicas, como hipocaliemia, hipomagnesemia e hiperglucemia.

Se recomienda precaución especial en pacientes con antecedentes hepáticos, ya que se han reportado casos de disfunción hepática, hepatitis e insuficiencia hepática en aquellos tratados con CSP en combinación con múltiples medicamentos.

1.3.3.1.7. Formulaciones comerciales de caspofungina

La CSP se presenta en España como un polvo liofilizado para reconstitución en concentraciones de 50 y 70 mg, fabricado por diversos laboratorios como Cancidas de Merck Sharp & Dohme B.V., Caspofungina Lorien de Laboratorios Lorien S.L., Caspofungina Normon de Laboratorios Normon S.A., Caspofungina Stadafarma de Laboratorio Stada S.L.,

Caspofungina Hikma de Hikma Farmacéutica S.A., Caspofungina Sun de Sun Pharmaceutical Industries B.V. y Caspofungina Tevagen de Teva Pharma S.L.U. Este fármaco, destinado exclusivamente a la administración intravenosa, requiere reconstitución con una solución estéril, como solución salina normal o agua estéril para inyección, antes de su uso. Es crucial que la solución resultante se administre lentamente por perfusión, generalmente durante un periodo de una hora, para minimizar el riesgo de reacciones adversas como fiebre, escalofríos o rubor facial, descritas principalmente tras la administración en dosis diaria única (Patil & Majumdar, 2017).

Las presentaciones de CSP están diseñadas para garantizar la estabilidad del producto y una adecuada biodisponibilidad cuando se administre por vía intravenosa (Quiles-Melero & García-Rodríguez, 2021). La estabilidad del fármaco en su forma liofilizada permite su almacenamiento en nevera, entre 2 °C y 8 °C, con un periodo de validez de 2 años. El concentrado reconstituido debe utilizarse inmediatamente, aunque puede conservarse hasta 24 horas a temperatura ambiente o hasta 48 horas en refrigeración si se diluye adecuadamente. Dado que no contiene conservantes, debe utilizarse de inmediato tras la preparación, y cualquier tiempo de conservación en uso no debe superar las 24 horas en refrigeración, a menos que se haya manejado en condiciones asépticas controladas. Es importante mencionar que la reconstitución debe realizarse siguiendo las recomendaciones del fabricante para asegurar una correcta dilución y evitar la formación de precipitados (Quiles-Melero & García-Rodríguez, 2021; Szymański et al., 2022).

Debido a la complejidad de su formulación y uso, este fármaco está clasificado en España como medicamento de prescripción médica restringida. Específicamente, se trata de fármacos de uso hospitalario, tal como se indica con la sigla "H" en su cartón. Esta clasificación responde a sus características farmacológicas, su novedad en el mercado y su relevancia para la salud pública, lo que implica que su administración y seguimiento deben realizarse exclusivamente en un entorno hospitalario, garantizando así un manejo adecuado de los pacientes.

La disponibilidad exclusiva de formulaciones intravenosas de CSP en España resalta la importancia de este trabajo en el desarrollo de alternativas terapéuticas y nuevas formulaciones tópicas que puedan mejorar la eficacia y accesibilidad del tratamiento.

1.3.4. Otros fármacos antifúngicos

Además de las equinocandinas, otros fármacos antifúngicos importantes incluyen la **terbinafina** y la **5-fluorocitosina**, comúnmente conocida como flucitosina (Figura 8). La terbinafina, un agente alílico, actúa inhibiendo la enzima escualeno epoxidasas en la biosíntesis del ergosterol, un componente clave de la membrana celular fúngica. Esta acción provoca la acumulación de escualeno, que resulta tóxico para las células fúngicas, y

se utiliza comúnmente para tratar infecciones cutáneas y onicomicosis. Por otro lado, la flucitosina es un antifúngico de acción específica que interfiere en la síntesis de ADN y ARN al ser convertido en 5-fluorouracilo en las células fúngicas. Este mecanismo lo hace eficaz en combinación con otros antifúngicos, especialmente en el tratamiento de criptococosis y candidiasis sistémica (Quiles-Melero & García-Rodríguez, 2021). La combinación de estos agentes con otros antifúngicos permite una mayor eficacia en el tratamiento de infecciones fúngicas complejas.

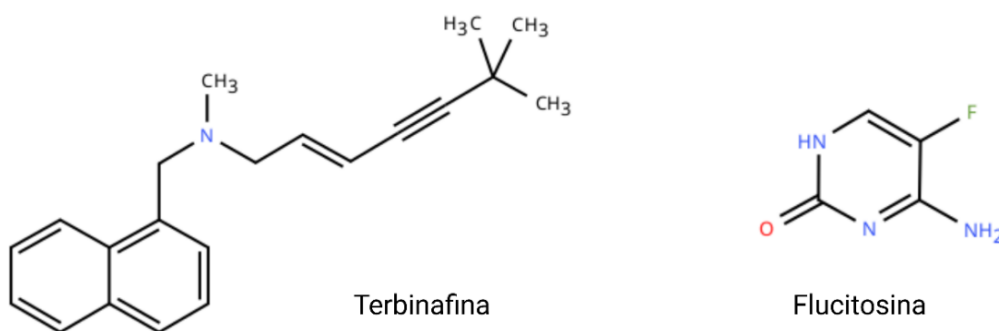


Figura 8. Estructura química de terbinafina y flucitosina.

1.4. Administración tópica

La administración tópica de medicamentos representa una vía atractiva debido a su naturaleza no invasiva y la ausencia de dolor, lo que facilita su uso por parte del paciente y asegura una alta aceptación general. Esta administración se lleva a cabo mediante la aplicación directa del medicamento sobre la piel o las mucosas. Aunque generalmente se emplea para lograr un efecto farmacológico local en el tejido donde se aplica, también puede utilizarse para obtener un efecto sistémico, es decir, efecto en otros tejidos u órganos del cuerpo tras la absorción sistémica del fármaco (Roberts et al., 2021).

La administración tópica, tanto en piel como en mucosas, es una vía eficaz para el tratamiento localizado, permitiendo reducir los efectos secundarios sistémicos. Sin embargo, su eficacia puede estar limitada por factores como la variabilidad en la absorción y el riesgo de irritación local. En el caso de la piel, la acción es más superficial y controlada, mientras que, en las mucosas, ya sea bucal, vaginal u ocular, se logra una absorción más rápida, pero esta vía de administración puede resultar incómoda y, en algunos casos, favorecer la rápida eliminación del fármaco. Además, es importante considerar la formulación del medicamento y su capacidad para penetrar las barreras biológicas específicas de cada tipo de tejido (Kulchar et al., 2023).

1.4.1. Mucosa ocular

1.4.1.1. Fisiología de la mucosa ocular

El ojo humano es un órgano altamente delicado y complejo, formado por diversas estructuras que trabajan en conjunto para permitir la visión (Figura 9). En promedio, un ojo normal tiene un diámetro de entre 2,2 y 2,7 cm, con una circunferencia que varía entre 6,9 y 8,5 cm y una superficie total de aproximadamente 20 cm². De esta superficie, alrededor de 1,3 cm² pertenecen a la córnea y unos 16 cm² a la esclera (Kels et al., 2015).

La mucosa ocular es una parte esencial del sistema visual, ya que protege las estructuras internas del ojo y ayuda a mantener su correcto funcionamiento. Está compuesta principalmente por la conjuntiva y la córnea. La conjuntiva es una membrana delicada y transparente que recubre el interior de los párpados (conjuntiva palpebral) y la superficie frontal de la esclerótica (conjuntiva bulbar). Está compuesta por tres capas: el epitelio externo, que contiene células caliciformes productoras de mucina para lubricar el ojo; una sustancia propia, con nervios y vasos para defensa inmunológica; y una capa submucosa que aporta soporte estructural (Sridhar, 2018). La córnea es la parte frontal y transparente del ojo que transmite y enfoca la luz hacia el interior del ojo. Se divide en tres capas principales: el epitelio corneal que actúa como una barrera protectora, el estroma que es una capa compacta a base de agua y colágeno y el endotelio corneal que regula el contenido de agua en el estroma (Kels et al., 2015; Sridhar, 2018). Todo esto se observa con mayor detalle en la Figura 10.

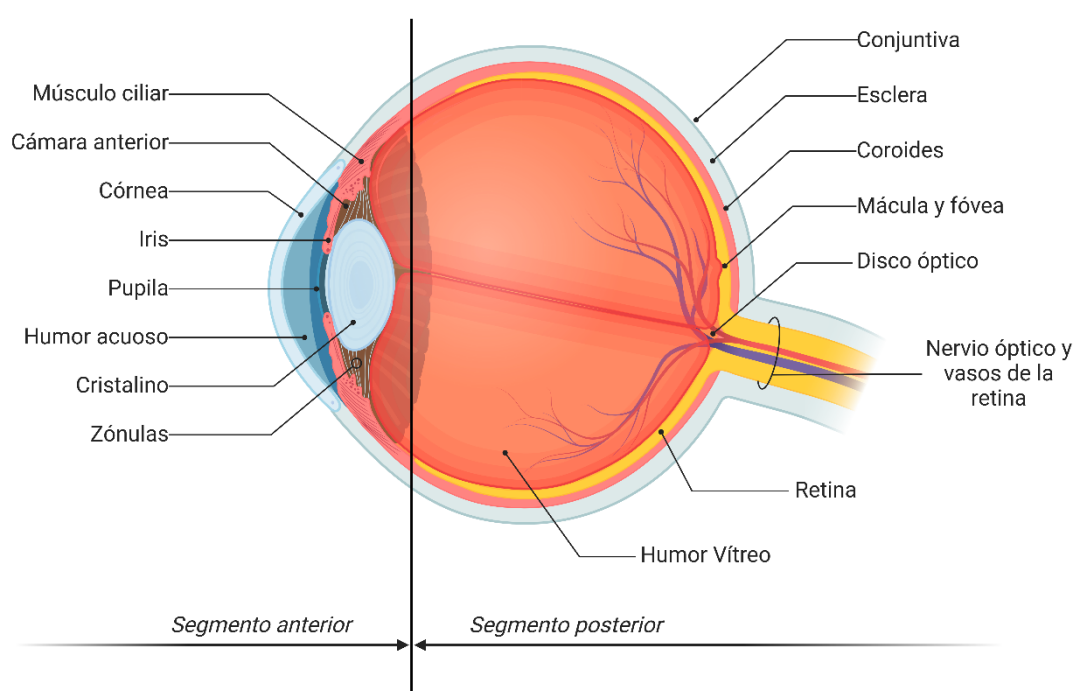


Figura 9. Anatomía del ojo humano.

El segmento anterior del ojo incluye la película lagrimal, la pupila, el cristalino y el cuerpo ciliar (Figura 9). La película lagrimal, producida por las glándulas y secreciones epiteliales, cubre la córnea y la conjuntiva, protegiendo y lubricando el ojo, además de facilitar la absorción de fármacos tópicos (S. Ahmed et al., 2023). La pupila regula la entrada de luz, mientras que el cristalino, ubicado detrás de ella, enfoca la luz en la retina (Kels et al., 2015). El cuerpo ciliar ajusta la forma del cristalino y produce el humor acuoso que nutre este segmento del ojo.

El segmento posterior del ojo comprende la esclerótica, la coroides, la retina, el humor vítreo y el nervio óptico (Figura 9). La esclerótica, compuesta de colágeno, protege y da estructura al ojo (Kels et al., 2015; Sridhar, 2018). La coroides, entre la esclerótica y la retina, suministra nutrientes a la retina. La retina, una capa de células neuronales, convierte la luz en señales eléctricas que el nervio óptico transmite al cerebro para procesar las imágenes (Kels et al., 2015). El humor vítreo es un tejido conectivo avascular y transparente con consistencia de gel que llena el espacio entre el cristalino y la retina, mantiene la forma ocular y permite el paso de la luz (Kels et al., 2015).

El grosor de los tejidos oculares varía según la región anatómica. El epitelio corneal tiene un grosor de entre 50 y 60 μm , mientras que el endotelio corneal es mucho más delgado, con un grosor promedio de 4 a 6 μm . El estroma, que representa alrededor del 90% del grosor de la córnea, mide aproximadamente entre 450 y 500 μm y está compuesto principalmente de colágeno organizado en láminas (Kels et al., 2015; Sridhar, 2018). Por otro lado, la conjuntiva bulbar, que cubre la parte blanca del ojo, tiene un grosor variable de 15 a 20 μm , siendo más delgada que la conjuntiva palpebral, que recubre la parte interna de los párpados y puede alcanzar hasta 40 μm (Sridhar, 2018).

El ojo está recubierto por una fina película lagrimal compuesta por tres capas: la lipídica, la acuosa y la mucosa (Figura 10) (S. Ahmed et al., 2023; Kels et al., 2015). Su volumen en la superficie ocular se mantiene alrededor de 7 μL debido a la constante evaporación y al parpadeo. La producción de lágrimas es de aproximadamente 1 a 2 μL por minuto. Estas lágrimas contienen mucinas, que forman un recubrimiento en forma de gel sobre el epitelio ocular, proporcionando lubricación y protección contra agresores externos (S. Ahmed et al., 2023; Kels et al., 2015).

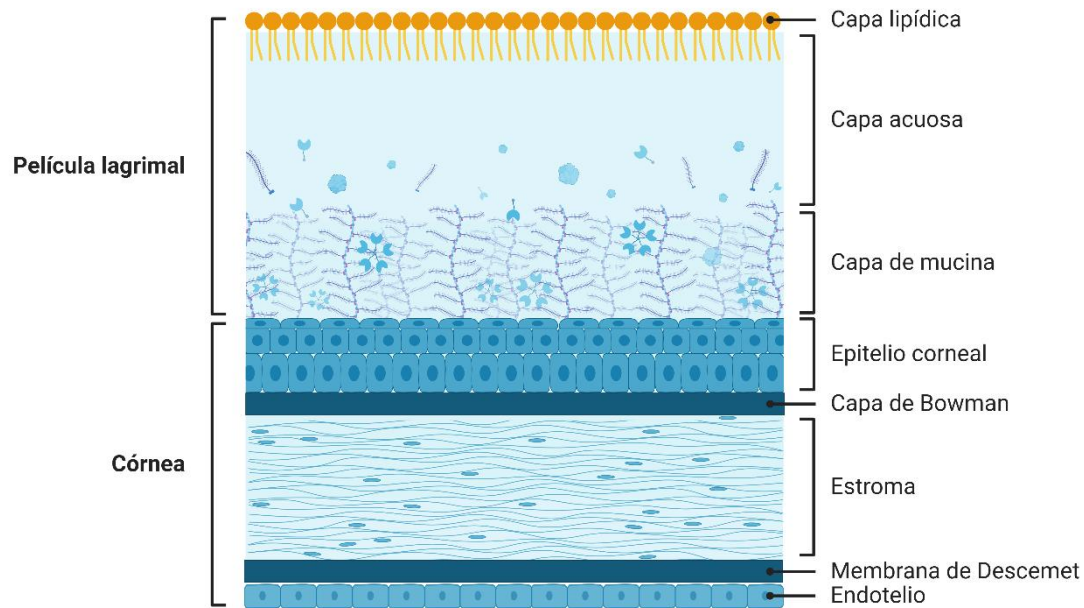


Figura 10. Anatomía de la película lagrimal y la córnea.

Para el tratamiento de afecciones oculares, existen diversas vías de administración de fármacos, cada una con sus propias características, beneficios y desventajas. La administración tópica es una de las vías más utilizadas en el tratamiento de afecciones oculares debido a su facilidad de aplicación y rápida acción sobre la mucosa ocular. La principal ventaja reside en la capacidad de proporcionar concentraciones elevadas del principio activo directamente en el lugar de la infección, evitando la necesidad de exposición sistémica y reduciendo el riesgo de efectos adversos generales. A diferencia de otras vías, permite un tratamiento localizado, lo que resulta fundamental en infecciones como la queratitis fúngica, donde es necesario alcanzar concentraciones terapéuticas elevadas en la córnea y la conjuntiva (Permana et al., 2021).

Por otro lado, la administración tópica evita complicaciones asociadas a otras vías, como la toxicidad hepática o renal que pueden presentar los antifúngicos sistémicos, y reduce el riesgo de interacciones con otros fármacos. También ofrece la posibilidad de realizar aplicaciones repetidas a lo largo del día, lo que favorece un control más preciso de la infección. No obstante, la necesidad de administraciones frecuentes puede volverse tediosa para el paciente, lo que podría comprometer la constancia en el tratamiento y afectar sus resultados. Por otro lado, la eliminación lagrimal y las barreras oculares pueden limitar la biodisponibilidad del fármaco (S. Ahmed et al., 2023; Gaudana et al., 2010), lo que ha llevado al desarrollo de diversas estrategias para mejorar su permanencia en la superficie ocular.

En las últimas décadas, ha habido un creciente interés en la creación de nuevas formulaciones para la administración ocular de medicamentos. Este interés surge de la necesidad de superar las barreras fisiológicas que pueden limitar la efectividad de los

tratamientos oculares. En este contexto, las formulaciones basadas en polímeros han emergido como una solución prometedora para mejorar la administración de fármacos a través del ojo. Por ejemplo, los sistemas de gelificación *in situ*, que cambian de estado líquido a gel al entrar en contacto con la mucosa ocular, mejorando la retención del fármaco sin comprometer la visión (Gratieri et al., 2011). Estos sistemas, basados en polímeros como los poloxámeros, son especialmente destacables por su capacidad para mejorar la solubilidad y estabilidad de los fármacos, así como para proporcionar una liberación controlada del principio activo.

En términos de formulación, los colirios son la presentación más utilizada debido a su facilidad de aplicación y rápida distribución en la superficie ocular. Sin embargo, en casos donde se requiere una mayor permanencia del fármaco, los ungüentos oftálmicos podrían ser una alternativa eficaz, especialmente para uso nocturno. Estos ungüentos forman una película protectora en el ojo que prolonga la liberación del principio activo, permitiendo una acción terapéutica más prolongada durante el descanso nocturno.

Si bien la necesidad de aplicaciones frecuentes sigue siendo un desafío, los avances en formulaciones oftálmicas continúan mejorando la eficacia de la vía tópica, consolidándola como la mejor opción para el tratamiento de infecciones fúngicas oculares (Permana et al., 2021).

1.4.1.2. Limitaciones de la vía ocular

La administración de fármacos a través del ojo supone importantes limitaciones debido a la compleja estructura de la mucosa ocular, diseñada precisamente para proteger al ojo de agentes externos y mantener un ambiente fisiológico estable.

Una de las principales barreras para esta vía de administración es la película lagrimal, que se renueva constantemente por el parpadeo y la secreción de lágrimas. Este mecanismo provoca una rápida eliminación de los fármacos administrados tópicamente, con hasta un 90% de la dosis perdiéndose en cuestión de minutos debido al drenaje lagrimal y la dilución en la película lagrimal. Esto no solo reduce significativamente la biodisponibilidad ocular, sino que también transporta el fármaco hacia la cavidad nasal, donde puede ser absorbido sistémicamente, lo que aumenta el riesgo de efectos secundarios (S. Ahmed et al., 2023).

Otra limitación es la barrera corneal. El epitelio corneal, siendo altamente lipofílico, dificulta el paso de moléculas hidrofílicas. Por otro lado, el estroma, que constituye la mayor parte del grosor de la córnea, es más accesible para los fármacos hidrosolubles. Sin embargo, la combinación de las propiedades hidrofóbicas del epitelio y las características hidrofílicas del estroma limita la penetración de muchas moléculas terapéuticas. Además, el endotelio corneal, aunque más permeable que el epitelio, actúa como una barrera

adicional que regula el paso de sustancias desde el estroma hacia las estructuras internas del ojo (Sridhar, 2018).

La conjuntiva, en comparación con la córnea, presenta una mayor permeabilidad debido a su epitelio menos denso. No obstante, su rica vascularización favorece la absorción sistémica, lo que puede disminuir la cantidad de fármaco que alcanza el tejido ocular y aumentar el riesgo de efectos secundarios sistémicos (Sridhar, 2018).

1.4.2. Mucosa oral

1.4.2.1. Fisiología de la mucosa oral

La cavidad oral es la primera sección del sistema digestivo y tiene un papel clave en funciones como la masticación, la deglución y la percepción del gusto. Está formada por diversas estructuras, como los labios, las mejillas, la lengua, las encías, el paladar y el suelo de la boca (Figura 11). Estas áreas están recubiertas por una mucosa especializada que varía en grosor, tipo de epitelio y funciones según su ubicación (Johnston & Johnston, 2015).

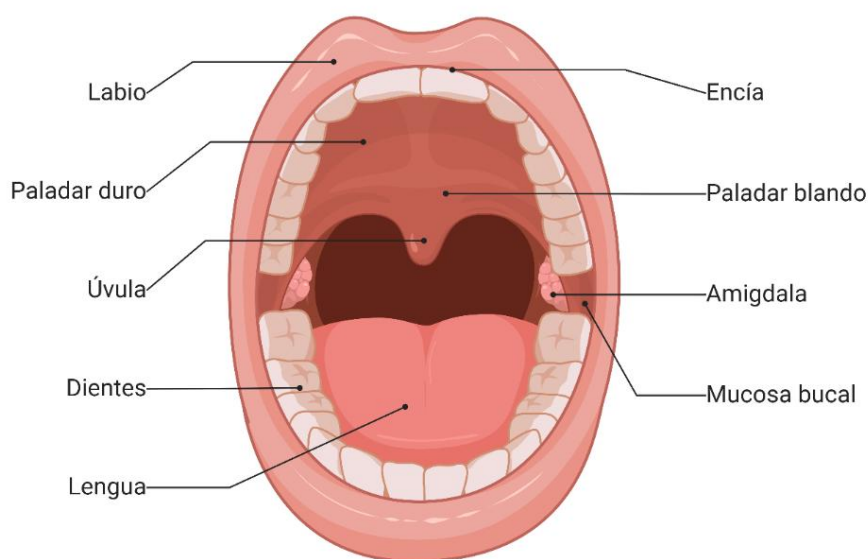


Figura 11. Anatomía de la boca.

La mucosa oral se compone de dos capas principales (Figura 12): el epitelio y el tejido conectivo, con características estructurales y funciones distintas (Johnston & Johnston, 2015). El epitelio, que es la capa más externa y de origen ectodérmico, está formado por un epitelio escamoso estratificado que puede ser queratinizado, paraqueratinizado o no queratinizado. Su principal función es proteger los tejidos subyacentes de agresiones externas, formando una barrera protectora con células firmemente unidas (Johnston & Johnston, 2015). Por debajo del epitelio se encuentra el tejido conectivo, conocido como lámina propia o corion, que deriva del ectomesenquima. Esta capa proporciona soporte,

nutrición e inervación al epitelio, gracias a las papilas que acercan los vasos sanguíneos y las terminaciones nerviosas a las capas superficiales del epitelio (Madani et al., 2014). Entre el epitelio y el tejido conectivo se sitúa la membrana basal, que conecta el epitelio avascular con el tejido conectivo vascular. En algunas áreas, especialmente donde hay mayor movilidad, puede existir una submucosa adicional de tejido conectivo laxo que une la mucosa con las estructuras subyacentes (Johnston & Johnston, 2015). Para mantener la mucosa oral húmeda, lo cual es esencial para la integridad de los tejidos, las glándulas salivales principales y accesorias producen saliva continuamente (Famuyide et al., 2022).

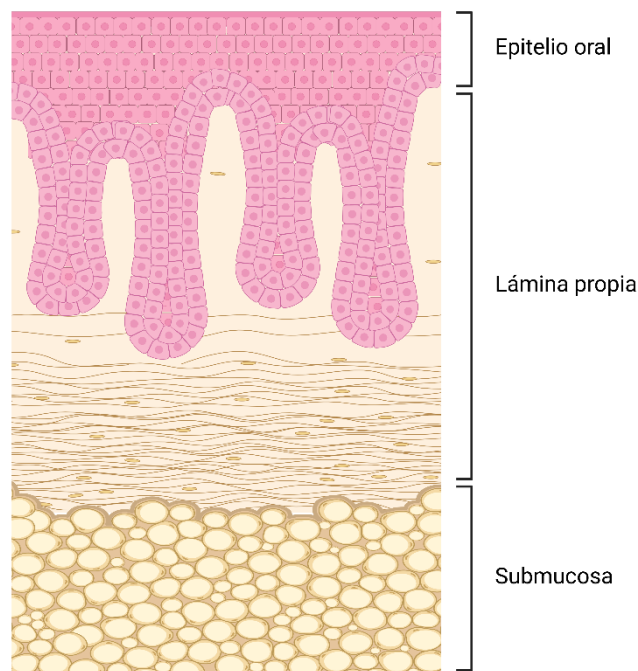


Figura 12. Estructura y capas de la mucosa bucal.

La mucosa oral se clasifica en tres tipos principales según su función y ubicación:

- **Mucosa de revestimiento:** Se encuentra en áreas que no están expuestas a fricción o presión, como el interior de los labios, las mejillas, el paladar blando y la superficie inferior de la lengua. Este tipo de mucosa tiene un epitelio no queratinizado y una submucosa bien definida, lo que le permite adaptarse a los movimientos de las mejillas, labios y lengua (Johnston & Johnston, 2015).
- **Mucosa masticatoria:** Localizada en zonas sometidas a presión y fricción, como las encías y el paladar duro. Su epitelio puede ser queratinizado o paraqueratinizado y está firmemente adherido al hueso subyacente, sin submucosa en la mayoría de las áreas (Johnston & Johnston, 2015).
- **Mucosa especializada:** Cubre la superficie dorsal y lateral de la lengua, donde se encuentran las papilas gustativas. Esta mucosa tiene una estructura irregular y una lámina propia con una densa inervación (Madani et al., 2014). La submucosa en esta

región contiene glándulas que mantienen la humedad del epitelio y de las papilas gustativas (Famuyide et al., 2022).

En la cavidad oral, se identifican tres áreas principales para la administración de fármacos: la región bucal, que incluye mejillas y labios; la zona sublingual, debajo de la lengua; y el resto de la mucosa, principalmente el paladar blando y la lengua (Johnston & Johnston, 2015). El epitelio de la mucosa bucal, con un grosor de 500-600 μm , es más grueso en comparación con el epitelio sublingual, que mide entre 100 y 200 μm . El epitelio gingival tiene un grosor de 200 μm y es de tipo queratinizado (Johnston & Johnston, 2015). La mucosa bucal abarca un área de 100 cm^2 y tiene un flujo sanguíneo de aproximadamente 2.4 $\text{mL}/\text{min}/\text{cm}^2$, mientras que la mucosa sublingual, con un área de 26.5 cm^2 , presenta un flujo de 1.0 $\text{mL}/\text{min}/\text{cm}^2$ (Madani et al., 2014). La saliva, con un flujo constante de 0.5 mL/min , actúa como lubricante y protector del epitelio. Además, el moco secretado por las glándulas salivares forma una capa protectora que ayuda a mantener la hidratación y la función barrera de la mucosa (Famuyide et al., 2022).

La administración de medicamentos por vía oral es cómoda y efectiva tanto para afecciones locales como sistémicas, utilizando las vías sublingual, bucal y gingival (Nguyen & Hiorth, 2015; Patel et al., 2011). Dentro de estas, la administración tópica es una de las más utilizadas debido a su facilidad de aplicación y rápida acción sobre la mucosa bucal. Su principal ventaja es que, al aplicar el fármaco directamente en el área afectada, se evita la necesidad de exposición sistémica y se reducen los efectos secundarios, como problemas gastrointestinales o hepáticos. La mucosa oral, debido a su alta vascularización, presenta una elevada permeabilidad que, junto con factores como la deglución y la salivación, puede dificultar la retención del fármaco en la zona de aplicación. Esto podría llevar a una eliminación prematura del medicamento, reduciendo su eficacia terapéutica. Para lograr una acción local óptima en las mucosas bucal y sublingual, es esencial desarrollar formulaciones que prolonguen su tiempo de permanencia en el sitio de aplicación y minimicen la absorción sistémica. Este enfoque es crucial en el tratamiento de infecciones como la candidiasis oral.

Además, la administración tópica evita complicaciones asociadas a otras vías, como la toxicidad hepática o renal que pueden presentar algunos fármacos sistémicos, y reduce la posibilidad de interacciones medicamentosas. Al igual que en la ocular, existe la posibilidad de realizar aplicaciones repetidas a lo largo del día, favoreciendo un control más preciso de la infección. Sin embargo, esta necesidad de múltiples administraciones puede resultar incómoda para el paciente, afectando la adherencia al tratamiento y, en consecuencia, su eficacia terapéutica. Asimismo, el movimiento constante de la lengua y la presencia de saliva presentan desafíos para la retención del fármaco en la mucosa bucal, lo que ha motivado el desarrollo de nuevas estrategias mejorar la permanencia del fármaco en la cavidad oral.

La formulación de nuevas soluciones para la administración bucal de medicamentos se ha centrado en la necesidad de superar las barreras fisiológicas que dificultan la efectividad de los tratamientos (Hua, 2020). Ejemplos de estos avances son los sistemas mucoadhesivos, que permiten una adherencia prolongada del medicamento a la mucosa, y los sistemas de gelificación *in situ*, que se transforman de líquido a gel al contacto con la mucosa oral. Entre las formulaciones utilizadas, los geles son populares debido a su fácil aplicación y capacidad para mantenerse en contacto con la mucosa por períodos prolongados. Para necesidades de mayor permanencia, los ungüentos o pastas grasas son una alternativa eficaz, al formar una película protectora en la mucosa que permite una liberación prolongada del principio activo. Los enjuagues bucales también son efectivos, asegurando una distribución uniforme del fármaco en toda la cavidad oral.

A pesar de los desafíos asociados con la palatabilidad y la retención del fármaco debido al movimiento constante de la lengua y la presencia de saliva, los avances en formulaciones para la administración bucal continúan mejorando la eficacia de la vía tópica, consolidándola como la mejor opción para el tratamiento de infecciones fúngicas.

1.4.2.2. Limitaciones de la vía bucal

La administración de fármacos por vía bucal, ya sea bucal o sublingual, permite evitar el efecto de primer paso hepático y la degradación en el entorno gastrointestinal, logrando un efecto sistémico sin pasar por el tracto digestivo (Johnston & Johnston, 2015). La absorción de estos fármacos puede variar según factores como el pH, la presencia de saliva que puede reducir la concentración del fármaco en la membrana de absorción y la permeabilidad de la mucosa. Además, la administración sublingual permite un inicio de acción más rápido en comparación con la vía oral clásica debido a la rica vascularización en esta región (Johnston & Johnston, 2015).

Sin embargo, esta vía también presenta limitaciones importantes. Los fármacos que son inestables a pH bucal, irritan la mucosa oral, tienen un sabor u olor desagradable, o causan alergias, pueden no ser adecuados para su administración por esta vía. La superficie disponible para la absorción bucal, aproximadamente 50 cm² en la mucosa bucal y 27 cm² en la sublingual, es mucho menor que la del tracto gastrointestinal, lo que limita la cantidad de fármaco que puede absorberse. Además, la mucosa bucal está en contacto continuo con saliva, que reduce la concentración del fármaco en la membrana de absorción, afectando la tasa de absorción junto con el coeficiente de permeabilidad del fármaco (Madani et al., 2014).

Factores como la sobrehidratación, que provoca un deslizamiento de la formulación, y la sequedad bucal, que retrasa la disolución del fármaco, también pueden comprometer la absorción. A esto se suman la menor permeabilidad de la mucosa bucal y los riesgos de pérdida del fármaco debido a la deglución involuntaria de saliva o del sistema de liberación,

así como las interferencias provocadas por el habla, la alimentación y la bebida (Johnston & Johnston, 2015).

1.4.3. Mucosa vaginal

1.4.3.1. Fisiología de la mucosa vaginal

Los órganos genitales femeninos se dividen en externos e internos, cada uno con funciones clave en la reproducción, el ciclo menstrual y el parto. Los órganos externos, conocidos colectivamente como la vulva, incluyen el monte de Venus, los labios mayores y menores, el clítoris y el vestíbulo vaginal, que alberga la abertura vaginal, el meato urinario y las glándulas de Bartolino, responsables de la lubricación vaginal. Los órganos internos del aparato reproductor femenino (Figura 13) comprenden los ovarios, las trompas de Falopio, el útero, el cuello uterino o cérvix y la vagina (Graziottin & Gambini, 2015; Puppo, 2013).

La vagina es un conducto fibromuscular expandible con forma de “S” longitudinal que se extiende desde el cuello del útero hasta el vestíbulo. Su longitud varía entre 7 y 12 cm y su diámetro entre 2 y 5 cm, abarcando una superficie total de aproximadamente 80 a 110 cm². Este canal muscular presenta dos secciones: una parte inferior convexa y una parte superior más ancha, que se sitúa casi horizontalmente cuando la mujer está de pie, formando un ángulo de aproximadamente 130° (Srikrishna & Cardozo, 2013; Subi et al., 2024).

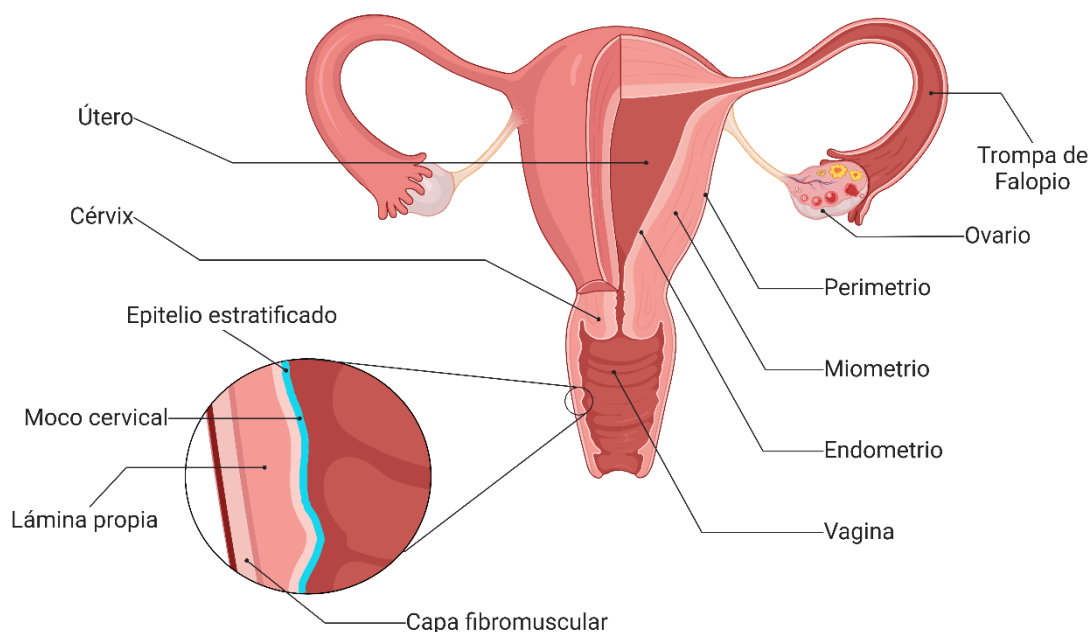


Figura 13. Anatomía de los órganos internos del aparato reproductor femenino.

Las paredes vaginales están compuestas por varias capas: el epitelio estratificado no queratinizado, cuyo grosor varía según el ciclo menstrual; la lámina propia, formada por tejido conectivo; la capa muscular, que proporciona elasticidad y soporte; y la túnica adventicia, una capa externa que protege y estabiliza la estructura vaginal (Graziottin & Gambini, 2015). La capacidad de expansión de la vagina se debe a los numerosos pliegues en el epitelio superficial, lo que permite una considerable extensión de su superficie. Aunque la vagina se clasifica como una mucosa, no tiene glándulas secretoras (Graziottin & Gambini, 2015). Sin embargo, su epitelio está cubierto por una fina capa de fluido, que proviene principalmente de la trasudación de las paredes vaginales y de las secreciones de las glándulas cervicales. La composición de este fluido varía con la edad, el ciclo menstrual y el estado de salud de la mujer (Srikrishna & Cardozo, 2013). En mujeres sanas en edad reproductiva, el pH vaginal oscila entre 3,5 y 4,5, fluctuando durante el ciclo menstrual y según la frecuencia de las relaciones sexuales. Este ambiente ácido se mantiene gracias a la producción de ácido láctico por los microorganismos residentes, principalmente del género *Lactobacillus* (Srikrishna & Cardozo, 2013).

En estudios comparativos, se ha observado que la anatomía y fisiología de la vagina humana son similares a las de especies animales como los bovinos y los porcinos, aunque la mucosa vaginal porcina es histológicamente más semejante a la humana, lo que facilita su uso en estudios de permeación y toxicología para el desarrollo de medicamentos de aplicación en mujeres (Graziottin & Gambini, 2015; Puppo, 2013).

La administración de medicamentos por vía vaginal ha ganado relevancia debido a las ventajas específicas que ofrece para el tratamiento de afecciones tanto locales como sistémicas. Esta vía permite una liberación controlada del fármaco directamente en el sitio de acción, lo que mejora la eficacia terapéutica y minimiza los efectos secundarios sistémicos. Además, la alta permeabilidad de la mucosa vaginal facilita la absorción de ciertos medicamentos, evitando el metabolismo de primer paso hepático que suele reducir la biodisponibilidad de los fármacos administrados por vía oral (Osmalek et al., 2021). Esta vía es especialmente útil para tratar infecciones locales, como la candidiasis vaginal, y para la administración de hormonas o anticonceptivos, ya que permite alcanzar concentraciones terapéuticas de manera más rápida y efectiva (das Neves et al., 2021).

El desarrollo de nuevas formulaciones y dispositivos para la administración vaginal de fármacos ha sido un campo de creciente interés en las últimas décadas debido a la necesidad de superar las barreras fisiológicas que limitan la eficacia de los tratamientos. En este contexto, las formulaciones basadas en polímeros han surgido como una solución prometedora. Polímeros como los poloxámeros y las gomas naturales han sido ampliamente estudiados debido a sus propiedades mucoadhesivas y su capacidad para formar geles sensibles a la temperatura, lo que mejora la retención del fármaco en la mucosa vaginal y prolonga su acción terapéutica (Carvalho et al., 2021; Osmalek et al., 2021). Los sistemas mucoadhesivos, como los termogeles, permiten que las formulaciones

permanezcan más tiempo en el sitio de acción, resistiendo la eliminación natural de las secreciones vaginales, lo que incrementa la eficacia del tratamiento (Caramella et al., 2015).

Asimismo, la vía vaginal ofrece ventajas en términos de comodidad y aceptación por parte de las pacientes. En comparación con otros métodos de administración, el uso de geles es menos invasivo y permite la autoadministración, mejorando la autonomía de la paciente y su cumplimiento terapéutico. Su uso en la terapia hormonal sustitutiva y en anticonceptivos de liberación prolongada es un claro ejemplo de su practicidad y eficacia.

A pesar de estas ventajas, también existen desafíos asociados con la administración vaginal de fármacos, como las variaciones en el pH vaginal, así como la posibilidad de irritación local o reacciones adversas en algunas pacientes. No obstante, los avances en formulaciones mucoadhesivas y de gelificación *in situ* continúan mejorando la efectividad y seguridad de esta vía de administración, consolidándola como una opción terapéutica de gran potencial para diversas condiciones médicas.

1.4.3.2. Limitaciones de la vía vaginal

Para mejorar la administración de medicamentos por vía vaginal, es crucial entender bien las características anatómicas y fisiológicas de la vagina, ya que estas influyen en la efectividad de los sistemas de dosificación. Factores como la temperatura y la composición de los fluidos vaginales pueden alterar propiedades fisicoquímicas de las formulaciones afectando su eficacia.

La eficacia de las formulaciones convencionales para uso vaginal se ve considerablemente limitada por la capacidad para limpiarse *per se* de esta región, lo que reduce la retención de fármacos.

Un desafío clave en el desarrollo de medicamentos vaginales es lograr una adecuada bioadhesión, es decir, la capacidad de los polímeros para adherirse a los tejidos biológicos. En particular, la mucoadhesión es un tipo de bioadhesión que ocurre entre los polímeros y las membranas mucosas (Subi et al., 2024). Las formulaciones vaginales tradicionales suelen tener problemas de distribución y retención dentro de la cavidad vaginal, además de causar goteo y sensaciones incómodas. Estos problemas pueden llevar a una baja adherencia al tratamiento y, en consecuencia, a una eficacia terapéutica reducida (Puppo, 2013). La importancia de la bioadhesión ha impulsado el uso de formulaciones mucoadhesivas en el tratamiento de enfermedades vaginales. Estas formulaciones utilizan polímeros bioadhesivos que mejoran la interacción con el epitelio mucoso, aumentando el tiempo de contacto del medicamento en el sitio de aplicación (Graziottin & Gambini, 2015).

Otro aspecto a considerar es el pH ácido de la vagina. Este ambiente puede interferir con la estabilidad y actividad de ciertos fármacos, lo que limita la selección de compuestos

adecuados para la formulación vaginal. Además, la presencia de una microbiota vaginal rica en *Lactobacillus spp.* no solo proporciona protección contra infecciones, sino que también puede afectar la farmacocinética de los medicamentos al alterar su absorción y metabolismo (Subi et al., 2024).

Finalmente, la absorción y distribución de medicamentos administrados por vía vaginal pueden verse afectadas por la variabilidad en la anatomía y fisiología de la vagina entre diferentes mujeres (Puppo, 2013). Factores como el grosor del epitelio vaginal, que cambia a lo largo del ciclo menstrual, y la cantidad de fluido vaginal presente, influyen en la biodisponibilidad de estos fármacos (Srikrishna & Cardozo, 2013). Además, la textura y el grosor del epitelio vaginal pueden actuar como barreras adicionales para la penetración de los medicamentos (Subi et al., 2024).

1.4.4. Piel

1.4.4.1. Fisiología de la piel

El órgano más grande del cuerpo humano, la piel, actúa como una barrera protectora entre el organismo y el entorno exterior. Además de ser el órgano más extenso, su peso varía entre 3 y 5 kg y en un adulto promedio puede cubrir un área de aproximadamente 1,50 a 2 m². En términos generales, la piel desempeña funciones esenciales como la protección mecánica, la regulación de la temperatura, el mantenimiento del equilibrio hídrico, la excreción, la percepción sensorial y la defensa inmunitaria (Ibrahim et al., 2021).

Compuesta por tres capas principales: la epidermis, la dermis y la hipodermis o tejido subcutáneo, la piel también alberga glándulas sebáceas, glándulas sudoríparas y folículos pilosos (Figura 14). La superficie cutánea suele estar cubierta por una emulsión epicutánea o manto hidrolipídico, formada a partir de los ácidos grasos de las secreciones sebáceas de los queratinocitos y el agua de las glándulas sudoríparas. Esta emulsión contribuye a mantener la función protectora de la piel y su flora cutánea (Gilaberte et al., 2016).

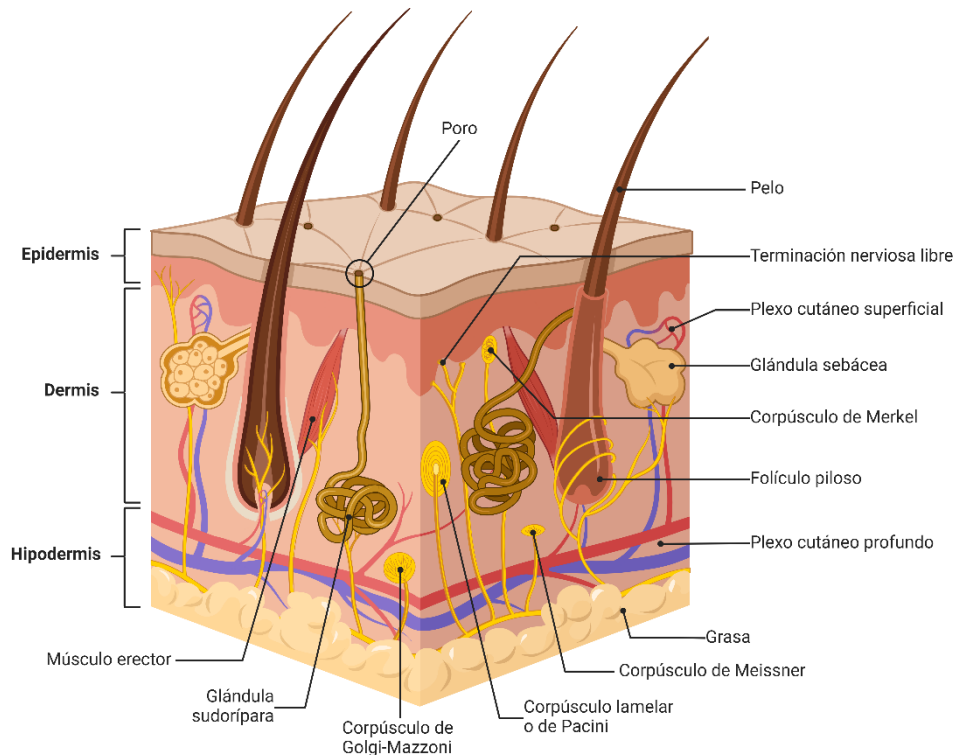


Figura 14. Anatomía de la piel.

La **epidermis** (Figura 15), la capa más externa de la piel, tiene un grosor promedio de un milímetro, aunque este puede variar dependiendo de la región del cuerpo. Es más gruesa en las palmas de las manos y las plantas de los pies, y más delgada en los párpados. Compuesta por múltiples capas de células llamadas queratinocitos, la epidermis forma una barrera impermeable. Esta capa se renueva cada dos meses y su función principal es mantener la piel hidratada y protegernos de la radiación solar (Gilaberte et al., 2016). La epidermis se subdivide en varias capas, que se organizan desde la más profunda hasta la más superficial:

- **Estrato basal o germinativo:** es una única capa de células en constante actividad. Es la responsable de la regeneración de la epidermis mediante la replicación celular continua. En ella se encuentran los melanocitos, células de forma estrellada con prolongaciones llamadas dendritas, que producen melanina, el pigmento que da color a la piel y la protege de los rayos solares. Además, en esta capa también se encuentran células del sistema inmunológico conocidas como células de Langerhans, encargadas de presentar antígenos a los linfocitos para iniciar la respuesta inmunitaria, y células de Merkel, que pertenecen al sistema neuroendocrino (Vestita et al., 2022).
- **Estrato espinoso:** situado por encima del estrato basal, está constituido por varias hileras de células que representan un estadio evolutivo de las células basales. Estas células están unidas entre sí y con las de la capa basal mediante puentes intercelulares a modo de espinas, creando una sólida armadura con continuidad citoplasmática (Gilaberte et al., 2016).

- **Estrato granuloso:** está compuesto por células aplanadas con gránulos de queratohialina. Estas células no se dividen y se dedican a la síntesis de queratina. Los gránulos contienen glicolípidos y esteroides, que ayudan a la impermeabilidad de la piel y a su hidratación natural (Gilaberte et al., 2016).
- **Estrato lúcido:** ubicado entre la capa granulosa y el estrato córneo, es la capa donde las células comienzan a perder sus orgánulos celulares debido a la acción de proteasas y nucleasas (Gilaberte et al., 2016).
- **Estrato córneo:** es la capa más externa de la epidermis y actúa como la principal barrera de la piel. Está compuesto por células muertas llamadas corneocitos, unidas por una sustancia lipídica. Los lípidos intercelulares incluyen lípidos neutros, esfingolípidos y lípidos polares, que contribuyen a la impermeabilidad y resistencia de la piel. Además, el estrato córneo se renueva constantemente a través de un proceso de descamación (Abdo et al., 2020).

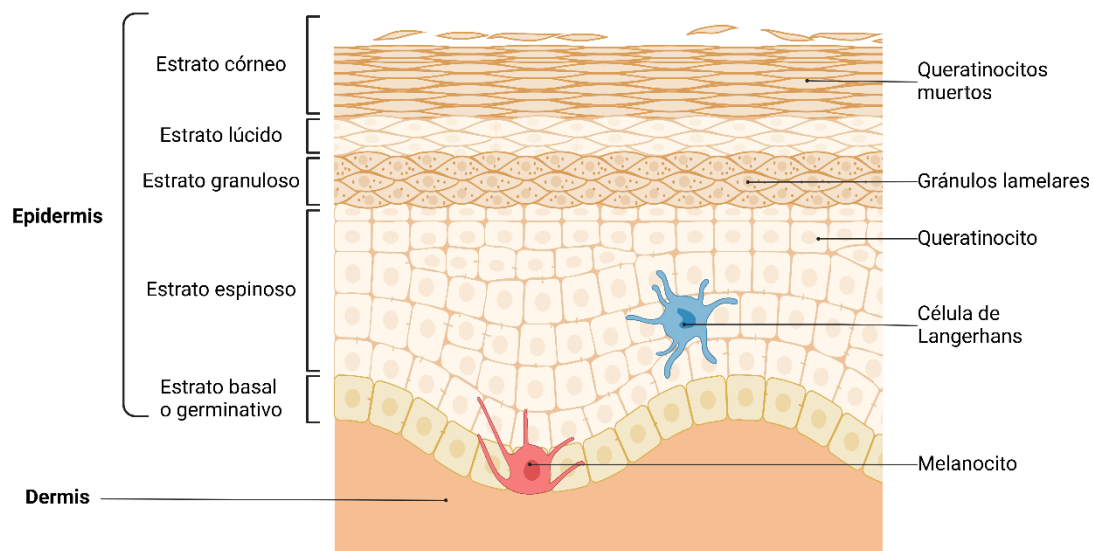


Figura 15. Estructura y capas de la epidermis.

La **dermis**, que constituye la mayor parte de la piel con un grosor aproximado de cuatro milímetros, se divide en tres zonas: la dermis papilar, la dermis reticular y la dermis profunda. A diferencia de la epidermis, no está formada por capas de células superpuestas, sino por una red de fibras de colágeno, elásticas y reticulares, que proporcionan resistencia, elasticidad y soporte. La dermis alberga varios componentes esenciales, como los anexos cutáneos (pelos, uñas, glándulas sebáceas y sudoríparas), los vasos sanguíneos que suministran nutrientes a la piel y las terminaciones nerviosas que facilitan la percepción sensorial (Gilaberte et al., 2016). Las fibras de colágeno proporcionan resistencia y flexibilidad, mientras que las fibras elásticas aseguran la elasticidad de la piel (Vestita et al., 2022). Aunque menos abundantes, las fibras reticulares juegan un papel crucial en el soporte de los anexos y los vasos sanguíneos. Los fibroblastos son las células predominantes en esta capa, encargadas de producir las fibras y la sustancia fundamental,

un material gelatinoso que contiene proteínas, electrolitos, glucosa y agua (Gilaberte et al., 2016). Además, la dermis alberga células del sistema inmunológico, como macrófagos y linfocitos, que desempeñan un papel crucial en las respuestas inflamatorias (Vestita et al., 2022).

La **hipodermis**, también conocida como tejido subcutáneo, es la capa más interna de la piel. Está formada por adipocitos, que son células de grasa encargadas de almacenar energía, proporcionar aislamiento térmico y amortiguar los impactos (Ibrahim et al., 2021; Vestita et al., 2022). Esta capa se organiza en lóbulos, los cuales están separados por trabéculas de colágeno y fibras elásticas. Además, la grasa presente en la hipodermis juega un papel crucial en el metabolismo de los lípidos y protege los órganos internos de las variaciones de temperatura (Abdo et al., 2020; Gilaberte et al., 2016).

La piel no solo constituye una barrera física, sino que también cumple con diversas funciones vitales para el organismo. A través de sus terminaciones nerviosas, la piel nos permite interactuar con el entorno, percibiendo estímulos como el calor, el frío, la presión y el dolor y poder responder a diversas situaciones. Además, la piel desempeña un papel crucial en la protección del organismo al actuar como una barrera contra agentes externos, tales como bacterias, sustancias químicas y radiaciones solares. Función que se complementa con su capacidad para mantener el equilibrio de líquidos y electrolitos, regular la temperatura corporal y participar en la síntesis de vitamina D, fundamental para el mantenimiento de la salud ósea. Así, la piel es un sistema integral que resguarda el cuerpo y facilita la homeostasis y el bienestar general (Gilaberte et al., 2016).

Los sistemas de administración cutánea de fármacos son una herramienta crucial en la farmacología moderna, facilitando tanto la administración local como sistémica de medicamentos. Esta vía ofrece múltiples beneficios, entre los que destacan la facilidad de uso y la reducción de efectos secundarios sistémicos (Roberts et al., 2021). La piel actúa como una barrera protectora, pero también permite la absorción de sustancias terapéuticas a través de sus distintas capas, facilitando la liberación controlada de los principios activos.

Entre los principales beneficios de la administración tópica se encuentra la acción localizada del fármaco, lo que permite tratar afecciones dermatológicas sin necesidad de exposición sistémica. Esto es especialmente útil en enfermedades como las infecciones fúngicas cutáneas, ya que los antifúngicos tópicos permiten una alta concentración del principio activo en la zona afectada. Además, la vía tópica evita el metabolismo de primer paso hepático, lo que mejora la biodisponibilidad de ciertos fármacos y reduce la carga hepática.

La administración tópica de fármacos a través de la piel ha cobrado relevancia debido a las dificultades inherentes a las barreras cutáneas, que limitan la penetración y eficacia de los tratamientos. Para superar estas limitaciones, los avances en formulaciones basadas en polímeros han abierto nuevas perspectivas en el desarrollo de sistemas de liberación

controlada. Una de las innovaciones más prometedoras ha sido el desarrollo de sistemas mucoadhesivos combinados con mecanismos de gelificación *in situ*. Estos sistemas son capaces de formar una barrera física en la superficie de la piel después de la aplicación, lo que les permite resistir la eliminación natural por sudor o fricción. La gelificación *in situ* asegura que el gel se forme en el lugar de aplicación, proporcionando una liberación gradual y controlada del principio activo (Caramella et al., 2015; Carvalho et al., 2021; Osmalek et al., 2021). Al combinar mucoadhesividad y gelificación, se obtiene un sistema ideal para tratamientos tópicos más efectivos. Estos sistemas no solo optimizan la liberación del fármaco, sino que también mejoran la comodidad del usuario.

1.4.4.2. Limitaciones de la vía cutánea

La piel, como barrera protectora del cuerpo humano, presenta varias limitaciones para la administración de fármacos, debido a su compleja estructura y funciones específicas. Una de las principales barreras es la penetración limitada, ya que la capa córnea de la piel puede dificultar la absorción de algunos medicamentos, impidiendo alcanzar niveles terapéuticos adecuados en tejidos más profundos (Gilaberte et al., 2016; Ibrahim et al., 2021). Además, algunos medicamentos tópicos pueden causar irritación o reacciones alérgicas en la piel, lo que limita su uso continuado (Vestita et al., 2022).

La absorción de fármacos a través de la piel también puede variar significativamente entre individuos debido a factores como la edad, el tipo de piel, la hidratación y la presencia de enfermedades cutáneas. Esta variabilidad puede complicar la dosificación y la eficacia del tratamiento (Abdo et al., 2020). Asimismo, la piel es menos permeable a los fármacos de alto peso molecular, lo que restringe el tipo de medicamentos que se pueden administrar eficazmente por esta vía (Gilaberte et al., 2016; Ibrahim et al., 2021).

Otro aspecto a considerar es la interacción con productos cosméticos. El uso de estos productos puede interferir con la absorción de medicamentos tópicos, reduciendo su eficacia.

1.4.5. Permeabilidad de las mucosas y la piel

La efectividad de los tratamientos tópicos está estrechamente relacionada con la permeabilidad de las mucosas y la piel. Por ello, es fundamental analizar estas propiedades para evaluar la eficacia de la CSP tras su aplicación tópicas.

En este sentido, la película lagrimal y la estructura de la córnea constituyen una barrera importante en la mucosa ocular. A pesar de que la alta vascularización de esta zona permite una rápida absorción de medicamentos, la película lagrimal puede diluir y eliminar el fármaco rápidamente, lo que supone una desventaja. Además, la sensibilidad de la

mucosa ocular restringe tanto la concentración como el tipo de formulación que se puede emplear.

A diferencia de la piel, la mucosa bucal presenta una mayor permeabilidad gracias a su epitelio más delgado y a una abundante red de vasos sanguíneos. Esta característica permite una absorción más eficiente de los medicamentos tópicos, lo cual es una ventaja importante. No obstante, la saliva puede reducir el tiempo de contacto del medicamento con la mucosa, diluyéndolo y eliminándolo rápidamente. Además, el sabor del medicamento puede resultar desagradable, lo que podría afectar la adherencia al tratamiento.

La mucosa vaginal es altamente permeable gracias a su epitelio escamoso no queratinizado y su entorno húmedo. Estas propiedades facilitan una excelente absorción de medicamentos, lo cual es beneficioso para tratar infecciones fúngicas. Sin embargo, la fluctuación del pH vaginal puede influir en la estabilidad y efectividad del medicamento. Además, la sensibilidad de la mucosa vaginal puede provocar irritación con ciertos excipientes y concentraciones del medicamento.

Por otro lado, la piel tiene una permeabilidad más baja en comparación con las mucosas debido a la presencia del estrato córneo. Esta baja permeabilidad puede ser una desventaja, ya que limita la absorción del medicamento. Sin embargo, la piel ofrece un área extensa para la aplicación de grandes cantidades de medicamento y actúa como una barrera protectora contra infecciones secundarias durante el tratamiento. Una manera de aumentar la absorción del fármaco a través de la piel es mediante el uso de potenciadores de permeabilidad, también conocidos como promotores.

En resumen, tanto las mucosas como la piel poseen propiedades de permeabilidad que presentan ventajas y desafíos específicos que son cruciales para la formulación de tratamientos tópicos con CSP. La comprensión detallada de estas características ha sido fundamental para desarrollar y evaluar diversas formulaciones, cada una optimizada para su aplicación en distintos tejidos. Este conocimiento es esencial no solo para mejorar la eficacia del tratamiento y minimizar los posibles efectos secundarios, sino también para ampliar el arsenal terapéutico disponible.

1.5. Formas farmacéuticas tópicos como vehículos de CSP para el tratamiento farmacológico de infecciones fúngicas mucocutáneas.

La CSP se presenta como un fármaco con gran potencial para el desarrollo de nuevas formulaciones para el tratamiento de infecciones fúngicas mucocutáneas. Aunque su uso tópico no ha sido previamente explorado, la experiencia clínica con su administración intravenosa sugiere un perfil de seguridad favorable, con menos efectos adversos que algunos tratamientos convencionales. El estudio de la administración tópica de CSP podría

ampliar sus aplicaciones terapéuticas, ofreciendo nuevas alternativas en el tratamiento de infecciones fúngicas resistentes o de difícil manejo.

En el caso de las infecciones fúngicas mucocutáneas, se prefieren preparados de aplicación local. Las formas farmacéuticas pueden clasificarse de acuerdo con su estado físico y vía de administración para la que están destinadas (Adepu & Ramakrishna, 2021). La siguiente tabla muestra las formas farmacéuticas más relevantes para cada vía de administración en función de estas clasificaciones

Tabla 5. Principales formas farmacéuticas, organizadas según su vía de administración y estado físico.

Vía de administración	Estado físico	Forma farmacéutica
Oftálmica	Líquido	Soluciones, suspensiones, sistemas coloidales
	Semisólido	Pomadas, cremas, geles
	Sólido	Insertos
	Gaseoso	Aerosoles
Nasal	Líquido	Soluciones, suspensiones
	Gaseoso	Aerosoles
Ótica	Líquido	Soluciones, suspensiones
	Semisólido	Pomadas, geles
	Gaseoso	Aerosoles
Bucal	Líquido	Soluciones, suspensiones
	Semisólido	Geles, pastas
	Sólido	Comprimidos
	Gaseoso	Aerosoles
Oral	Líquido	Polvos, granulados, cápsulas, comprimidos
	Sólido	Soluciones, suspensiones
Pulmonar	Gaseoso	Aerosoles
Vaginal	Líquido	Espumas
	Semisólido	Pomadas, cremas, geles
	Sólido	Comprimidos, óvulos
Rectal	Líquido	Soluciones, espumas
	Sólido	Supositorios
Cutánea	Líquido	Soluciones, espumas
	Semisólido	Pomadas, cremas, geles
	Sólido	Polvos, parches transdérmicas
Parenteral	Líquido	Soluciones, suspensiones, sistemas coloidales
	Sólido	Implantes

Cada vía presenta necesidades específicas que requieren formas farmacéuticas adecuadas. Para la administración ocular, los **colirios** destacan por su capacidad de liberar el principio activo de manera localizada en la superficie del ojo. En el ámbito de la cavidad

oral, los **enjuagues bucales** permiten una distribución uniforme del fármaco, mientras que las **pasta grasas**, gracias a su capacidad mucoadhesiva, ofrecen una liberación localizada y sostenida.

No obstante, los **hidrogeles** son especialmente relevantes debido a su versatilidad y aplicabilidad en todas las vías estudiadas, que son la oftálmica, bucal, vaginal y cutánea. su capacidad de liberar medicamentos de manera controlada, su biocompatibilidad, versatilidad en la administración de diferentes tipos de medicamentos y su uso en diversas aplicaciones médicas. Además, su consistencia adaptable mejora la comodidad y adherencia al tratamiento. Todo esto convierte a los hidrogeles en una opción prometedora para optimizar los tratamientos antifúngicos tópicos.

A continuación, se detallan de manera pormenorizada los diferentes tipos de formulaciones desarrolladas en esta tesis doctoral, con el objetivo de explorar su potencial terapéutico y contribuir a la mejora de los tratamientos disponibles.

1.5.1. Colirios

Los colirios son soluciones líquidas que destacan por su rápida acción debido a la disolución del principio activo, lo que facilita su absorción. Son fáciles de preparar y autoadministrar, lo que mejora la aceptación entre los pacientes. No obstante, su tiempo de permanencia en el ojo es corto. Aunque en general no afectan la capacidad visual, los colirios en suspensión pueden causar temporalmente una visión borrosa, siendo recomendable su aplicación por la noche (Y. Yang & Lockwood, 2022).

La elaboración de colirios debe cumplir varios requisitos galénicos esenciales. La esterilidad es fundamental para evitar infecciones oculares, por lo que se utilizan métodos como el calor seco, la filtración esterilizante y la esterilización por vapor. Las soluciones deben ser límpidas y libres de partículas. Además, es importante que el pH sea cercano al fisiológico para evitar molestias, y que la osmolaridad sea similar a la del fluido lagrimal (aproximadamente 300 mOsm/kg) para garantizar una mejor tolerancia.

Los colirios están formados por un vehículo líquido, principios activos y excipientes. Los principios activos pueden incluir agentes antiinflamatorios, antibióticos y antiglaucomatosos, entre otros. Los vehículos, por su parte, pueden ser acuosos u oleosos, dependiendo de la solubilidad y estabilidad del principio activo. Los excipientes comunes incluyen isotonzantes, reguladores de pH, viscosizantes, tensioactivos, cosolventes, antioxidantes y conservantes. Estos conservantes son fundamentales en las formulaciones acuosas y deben ser eficaces, estables, no irritantes y no tóxicos, aunque su selección puede ser complicada. Entre los conservantes más utilizados se encuentra el cloruro de benzalconio, cuyo uso prolongado puede causar daños acumulativos en la superficie ocular,

llevando al desarrollo de queratopatía tóxica, un efecto adverso grave que compromete la salud ocular (Goldstein et al., 2022).

El uso adecuado de colirios requiere precauciones básicas, como lavarse bien las manos antes de su aplicación para prevenir infecciones y evitar el contacto del aplicador con superficies, dedos o el propio ojo. Los colirios son de uso personal y no deben compartirse. Además, los envases abiertos tienen una vida útil limitada, generalmente de un mes, o de 24 horas en el caso de monodosis. Cumplir con la dosis y frecuencia indicadas, así como cerrar correctamente el envase tras cada uso, es esencial para preservar la efectividad del tratamiento y evitar la contaminación.

1.5.2. Enjuagues bucales

Los enjuagues bucales son soluciones destinadas a bañar la mucosa de la cavidad bucal. Este tipo de preparaciones son ideales para pacientes con dificultades de deglución, como en niños pequeños, ya que permiten ajustar la dosis. Favorecen la disolución del principio activo mejorando su absorción y acción terapéutica, además de atenuar el poder irritante sobre la mucosa. Sin embargo, presentan mayor riesgo de contaminación microbiológica, menor estabilidad y suelen percibirse más fácilmente los sabores desagradables.

Para garantizar su calidad, estas preparaciones deben ser estables tanto desde el punto de vista fisicoquímico como microbiológico. La estabilidad fisicoquímica depende de la elección de excipientes compatibles con el principio activo y entre sí, mientras que la estabilidad microbiológica se garantiza mediante envases multidosis que reduzcan el riesgo de contaminación. Además, es fundamental que las formulaciones tengan características organolépticas agradables para garantizar el cumplimiento terapéutico, lo que implica la incorporación de colorantes, aromatizantes y saborizantes que ayuden a mejorar el color, aroma y sabor de la formulación.

Al igual que los colirios, estas formulaciones líquidas están constituidas por un vehículo, uno o varios principios activos y diversos excipientes. El vehículo, componente mayoritario, facilita la adaptación posológica y su elección depende de la naturaleza del principio activo. Entre los más utilizados destacan el agua, el alcohol etílico y los jarabes. Estos últimos son preparaciones acuosas caracterizadas por un sabor dulce y consistencia viscosa. Son formulaciones diseñadas para enmascarar sabores desagradables, no contienen alcohol y presentan propiedades conservantes debido a su alta concentración de sacarosa, aproximadamente un 64%. Esta alta concentración no solo aporta dulzura, sino que también le otorga propiedades conservantes debido a la hipertonidad de la solución, que impide el desarrollo de microorganismos a través de un efecto osmótico. Sin embargo, no elimina la necesidad de añadir conservantes.

Los excipientes, que facilitan la preparación y estabilidad, mejoran las propiedades organolépticas y definen características fisicoquímicas, incluyen edulcorantes, aromatizantes, colorantes, conservantes, antioxidantes, viscosizantes, reguladores de pH y cosolventes.

La forma de incorporar el principio activo varía según la formulación. El método más común es disolver directamente el fármaco en la solución base. Sin embargo, en formulaciones viscosas como los jarabes, este proceso puede ser lento debido a la poca disponibilidad de agua libre. En estos casos, lo más eficaz es disolver primero el principio activo en una pequeña cantidad de agua antes de añadirlo a la mezcla base. Este procedimiento garantiza una integración homogénea y facilita su disponibilidad en la preparación final.

1.5.3. Pasta grasa

Una pasta grasa es una formulación caracterizada por una alta consistencia y que contiene una gran cantidad de sólidos finamente dispersos en un excipiente, que puede ser lipófilo o hidrófilo, dando lugar a pastas grasas o hidrófilas, respectivamente. Estas formulaciones son especialmente útiles para tratar afecciones en áreas expuestas a fricción o humedad, como la cavidad bucal.

Para su aplicación en la mucosa oral, las pastas grasas deben cumplir con ciertos requisitos galénicos. En primer lugar, es fundamental que posean propiedades mucoadhesivas, facilitando su adhesión a la mucosa y minimizando su eliminación por la acción de la saliva o el continuo movimiento de la lengua. Asimismo, los componentes deben ser compatibles y seguros, evitando efectos adversos como toxicidad o irritación. La selección de la base grasa debe realizarse con precaución, buscando un equilibrio que evite una oclusión excesiva, garantizando el confort del usuario y la adecuada oxigenación de los tejidos. También es fundamental que la formulación resista la dilución provocada por la saliva y mantenga su integridad. Finalmente, debe ofrecer características organolépticas agradables, como un sabor y olor aceptables, además de una textura que permita una buena adherencia sin escurrir, pero lo suficientemente flexible para adaptarse a las superficies bucales.

La composición de las pastas generalmente consiste en un vehículo graso con sólidos en polvo y excipientes adicionales. Entre los vehículos más utilizados destacan la vaselina y las parafinas, las cuales ofrecen plasticidad y capacidad oclusiva. También siliconas, como la dimeticona; ceras, como la de abejas; y glicéridos, como el aceite de oliva y el miristato de isopropilo. Entre los sólidos en polvo más usados están la pectina, la gelatina y la carboximetilcelulosa sódica. Los excipientes adicionales incluyen edulcorantes, como

sorbitol o sacarina sódica, para mejorar el sabor, aromatizantes para incrementar la palatabilidad y colorantes que proporcionan un aspecto homogéneo y atractivo.

La incorporación del principio activo puede hacerse disolviendo el fármaco en el vehículo, pero como muchos son solubles en agua, es común usar cosolventes como propilenglicol, polietilenglicol o glicerol para facilitar la integración sin comprometer su estabilidad ni eficacia.

1.5.4. Hidrogeles

Los hidrogeles son sistemas tridimensionales compuestos por polímeros hidrófilos entrecruzados física o químicamente. Estas matrices son capaces de retener grandes cantidades de agua o fluidos biológicos sin disolverse, gracias a su estructura reticulada. Esta característica los convierte en sistemas versátiles para diversas aplicaciones biomédicas, particularmente en la administración de fármacos, ingeniería de tejidos, y dispositivos terapéuticos avanzados (Alaghawani et al., 2024; B. Liu & Chen, 2024). Con el paso de los años, han ido evolucionando considerablemente, pasando de ser simples matrices físicas a plataformas funcionales que pueden responder a estímulos físicos, químicos o biológicos, lo que permite liberar fármacos de manera precisa y controlada (Hameed et al., 2024).

Entre sus ventajas destacan su excelente capacidad de hidratación, efecto refrescante, buena tolerancia y aceptación por parte de los pacientes, además de no ser untuosos al tacto (Alaghawani et al., 2024). Son biocompatibles, suaves, flexibles y adaptables a diversas superficies biológicas sin causar incomodidad, lo que los hace ideales para formulaciones tópicas y oftálmicas (Ho et al., 2022; Ullah et al., 2015). Gracias a sus propiedades tixotrópicas, pueden ajustar su consistencia según las necesidades clínicas (Alaghawani et al., 2024; Thang et al., 2023).

No obstante, presentan ciertas limitaciones como la incompatibilidad con principios activos que sufren hidrólisis, tendencia a la desecación, problemas de sinéresis (fenómeno irreversible que provoca la separación de fases y reduce la eficacia), y las dificultades para su esterilización por calor (Thang et al., 2023). Además, pueden tener baja resistencia mecánica y presentar problemas de degradación, lo que requiere modificaciones químicas o el uso de combinaciones con otros materiales (Ho et al., 2022; Ullah et al., 2015). A pesar de estas limitaciones, el potencial de los hidrogeles supera con creces sus inconvenientes, justificando su amplio uso y estudio.

1.5.4.1. Propiedades fisicoquímicas

Estas formulaciones poseen una combinación única de propiedades fisicoquímicas que las convierten en una herramienta valiosa en el ámbito farmacéutico. Destacan por su **capacidad para absorber grandes cantidades agua**, gracias a los grupos funcionales hidrofílicos presentes en su estructura. Esta característica les otorga una consistencia blanda y gelatinosa, además de facilitar el transporte de principios activos hidrosolubles a través de su matriz (E. M. Ahmed, 2013).

La **elasticidad y suavidad** de su estructura, comparable a la de los tejidos blandos del cuerpo humano, les permite adaptarse a diversas superficies biológicas sin causar incomodidad ni irritación, cualidad que los hace perfectos para aplicaciones que requieren contacto directo con el cuerpo (Ho et al., 2022).

Otra propiedad clave es su **biocompatibilidad**. La mayoría de ellos están diseñados para ser no tóxicos e inertes en contacto con tejidos vivos, lo que reduce significativamente las reacciones adversas (B. Liu & Chen, 2024). Además, presentan **permeabilidad selectiva**, permitiendo el paso de ciertos compuestos mientras restringen otros, lo que facilita el control de la liberación de fármacos y otros agentes terapéuticos (Hameed et al., 2024).

Algunos hidrogeles poseen capacidades de **respuesta a estímulos externos**, como el pH, la temperatura, la luz o la presencia de ciertos iones, ajustando su comportamiento físico y su capacidad para liberar principios activos en función de las condiciones del entorno (Thang et al., 2023). Esta característica los hace especialmente útiles en el desarrollo de sistemas de liberación controlada de fármacos.

Finalmente, las propiedades de los hidrogeles pueden ser personalizadas mediante la elección de polímeros, el ajuste del grado de reticulación o la incorporación de componentes adicionales, permitiendo adaptarlos a las necesidades específicas de cada aplicación.

1.5.4.2. Clasificación

La clasificación de los hidrogeles puede realizarse en función de diversos criterios, lo que permite adaptarlos a diferentes aplicaciones farmacéuticas. Las principales categorías incluyen (E. M. Ahmed, 2013; Hameed et al., 2024; Ho et al., 2022):

Según su origen

Los hidrogeles pueden clasificarse en naturales, sintéticos y mixtos. Los **naturales** están formados por polímeros derivados de fuentes biológicas, como el quitosán, el colágeno o el alginato. Son biocompatibles y biodegradables, aunque presentan limitaciones en cuanto a su resistencia mecánica. Por otro lado, los **sintéticos** están compuestos por polímeros como el polietilenglicol, el polivinil alcohol, la poliacrilamida o los poloxámeros. Estos materiales

ofrecen propiedades mecánicas superiores y una mayor estabilidad. Finalmente, los hidrogeles **mixtos** combinan polímeros tanto naturales como sintéticos para obtener mejores propiedades fisicoquímicas y una funcionalidad ampliada.

Según la composición polimérica

Se pueden clasificar en dos categorías principales: homopoliméricos y copoliméricos. Los **homopoliméricos** están formados por un solo tipo de monómero, que es la unidad estructural básica que compone cualquier red polimérica. Por otro lado, los hidrogeles **copoliméricos** están formados por dos o más tipos de monómeros diferentes, lo que permite mejorar sus propiedades.

Según su reticulación

Los hidrogeles pueden clasificarse en dos tipos principales en función del mecanismo de reticulación. La **reticulación física** se produce cuando los enlaces entre las cadenas del polímero se forman por interacciones físicas, como fuerzas electrostáticas, hidrofóbicas o enlaces de hidrógeno. Por su parte, la **reticulación química** implica la formación de enlaces covalentes entre las cadenas del polímero, proporcionando una mayor estabilidad estructural al hidrogel.

Según la configuración

Los hidrogeles **amorfos** carecen de una estructura cristalina ordenada, presentando cadenas poliméricas dispuestas aleatoriamente, lo que les confiere flexibilidad y una alta capacidad de absorción de agua. Los hidrogeles **semicristalinos** combinan regiones amorfas y cristalinas, lo que puede influir en propiedades como la rigidez y la resistencia mecánica. Por último, los hidrogeles **cristalinos** poseen una estructura con cadenas poliméricas ordenadas regularmente, lo que les confiere alta resistencia mecánica y baja capacidad de absorción de agua.

Según la carga eléctrica

Además de clasificarse por su origen, composición o reticulación, también pueden hacerlo en base a la presencia o ausencia de carga eléctrica en sus cadenas poliméricas. Los hidrogeles **no iónicos o neutros** no poseen carga eléctrica en sus cadenas poliméricas y están formados por polímeros neutros. Por otro lado, los **hidrogeles iónicos (aniónicos o catiónicos)** contienen grupos cargados eléctricamente en sus cadenas poliméricas; los aniónicos poseen cargas negativas y los catiónicos cargas positivas, lo que influye en gran medida en sus propiedades, la interacción con otras moléculas y su sensibilidad a cambios en el pH del medio. Finalmente, los **hidrogeles anfóteros o anfóliticos** contienen tanto grupos con cargas negativas como grupos con cargas positivas en sus cadenas poliméricas.

Según la respuesta

Otra clasificación se basa en el tipo de respuesta que los hidrogeles muestran frente a estímulos externos, ya sean de naturaleza física o química. Los hidrogeles que responden a **estímulos físicos** experimentan cambios en sus propiedades físicas, como volumen, forma o viscosidad, en respuesta a factores como la temperatura, la presión, la luz o campos magnéticos. Estos cambios suelen ser reversibles, permitiendo que el hidrogel recupere sus propiedades originales una vez que el estímulo desaparece. Por otro lado, los hidrogeles que responden a **estímulos químicos** sufren modificaciones en su estructura debido a variaciones en el pH, la concentración de iones, la presencia de ciertas moléculas o reacciones químicas. Estos cambios pueden ser reversibles o irreversibles, dependiendo del tipo de reacción química involucrada.

1.5.4.3. Polímeros empleados en la formación de hidrogeles

La formulación de hidrogeles exige una cuidadosa selección y combinación de polímeros, ya que estos determinan propiedades clave como la bioadhesión, la estabilidad y el perfil de liberación del fármaco.

Tras haber explorado las generalidades de los hidrogeles, sus ventajas, limitaciones y diversas clasificaciones, es conveniente centrarse en los polímeros empleados en este estudio: el quitosán y el poloxamer 407 (P407). Estos polímeros han sido seleccionados por sus propiedades particulares, mientras que el quitosán aporta mucoadhesión al hidrogel, el poloxamer 407 le confiere la capacidad de gelificación *in situ*.

1.5.4.3.1. Chitosán

La mucoadhesión, definida como la capacidad de un material para adherirse a las superficies mucosas, es una estrategia ampliamente utilizada para mejorar la biodisponibilidad de fármacos administrados por vías tópicas, como la bucal o vaginal (Kumar et al., 2022; Vasquez-Martínez et al., 2023). Este enfoque se basa en el uso de polímeros que sean capaces de interactuar con las mucinas presentes en las superficies mucosas, prolongando de este modo el tiempo de contacto de la formulación con el tejido y optimizar la eficacia (Kumar et al., 2022). El mecanismo de mucoadhesión sugiere que la cadenas poliméricas se entrecruzan con la mucina. Esta interacción está mediada por diferentes tipos de fuerzas, como puentes de hidrógeno, fuerzas de Van de Waals, interacciones electrostáticas y uniones hidrofóbicas (Kumar et al., 2022; Vasquez-Martínez et al., 2023).

Comprendiendo el mecanismo de mucoadhesión, es fundamental identificar polímeros que exhiban una interacción favorable con las mucinas. En este contexto, el

chitosán se presenta como un polímero con un gran potencial para el desarrollo de sistemas de liberación de fármacos mucoadhesivos. Este polímero natural, derivado de la desacetilación de la quitina, es un polisacárido abundante en los exoesqueletos de crustáceos y las paredes celulares de hongos. Posee una estructura lineal (Figura 16), compuesta por unidades de N-acetil-D-glucosamina y β -(1-4)-D-glucosamina, que le confiere propiedades como la biocompatibilidad. En solución acuosa ácida, el chitosán, presenta carga positiva, permitiéndole interactuar con las mucinas, cargadas negativamente, favoreciendo la mucoadhesión (Yuan et al., 2023).

Además de su capacidad mucoadhesiva, ha demostrado poseer propiedades antimicrobianas. La actividad antimicrobiana se debe a su estructura molecular, que le permite interactuar con las membranas celulares, alterando su permeabilidad y provocando la liberación de componentes celulares esenciales, lo que inhibe el crecimiento y la proliferación. Esta acción frente a bacterias y hongos, sumada a su biocompatibilidad y poder mucoadhesivo, hace que el chitosán sea especialmente útil en la elaboración de sistemas de liberación de fármacos para el tratamiento de infecciones mucocutáneas (Abd El-Hack et al., 2020; Yan et al., 2021).

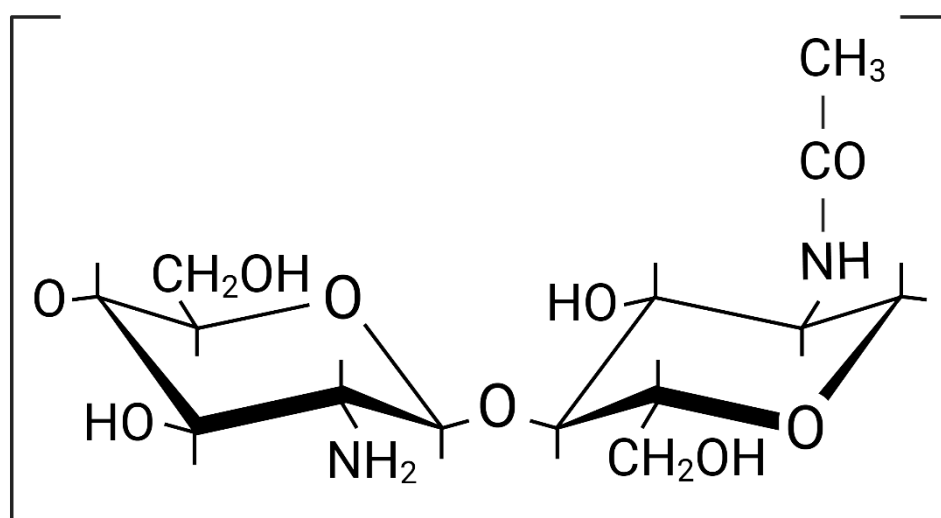


Figura 16. Estructura química del chitosán.

1.5.4.3.2. Poloxamer 407

La gelificación como respuesta a estímulos externos representa un avance en el desarrollo de sistemas de administración de fármacos, puesto que permite la transición de un estado líquido a gel bajo ciertas condiciones. Este fenómeno facilita una aplicación más sencilla y asegura una mayor retención en el lugar de acción (Zarrintaj et al., 2020). Los cambios desaparecen cuando cesan los estímulos que los provocaron y, en consecuencia, el estado original se recupera de forma reversible. Los estímulos externos pueden clasificarse

en físicos y químicos. Entre los estímulos físicos, la temperatura es el factor más destacado, mientras que, en el ámbito químico, lo es el pH.

Los hidrogeles termosensibles son aquellos cuya transición de fase es dependiente de la temperatura. Según la respuesta a la temperatura se pueden clasificar en: los de tipo positivo, que gelifican al enfriarse al alcanzar la temperatura crítica superior de disolución (UCST, del inglés Upper Critical Solution Temperature), y los de tipo negativo, que gelifican al calentarse al alcanzar la temperatura crítica inferior de disolución (LCST, del inglés Lower Critical Solution Temperature), fenómeno conocido también como gelificación térmica inversa (Y. Chen et al., 2021; Zarrintaj et al., 2020).

La preparación de hidrogeles termosensibles requiere el uso de polímeros con características moleculares específicas. En este sentido, se han empleado polímeros que contienen grupos hidrófobos, como metilo, etilo y propilo, en su estructura. Entre los polímeros más comunes se encuentran los copolímeros anfífilicos en bloques de poli (óxido de etileno) (PEO) y poli (óxido de propileno) (PPO), populares debido a que su LCST oscila entre los 25 y 32°C, muy cercana a la temperatura corporal. Se comercializan bajo el nombre de Pluronic® (Y. Chen et al., 2021).

El P407, también conocido como Pluronic® F-127, es un polímero capaz de autoensamblarse en micelas cuando alcanza una concentración micelar crítica (CMC) o una temperatura crítica micelar (CMT). Las micelas formadas son estructuras esféricas donde el núcleo, poco soluble, está rodeado por un borde flexible de bloques solubles. Al elevar la temperatura, las micelas se agrupan y forman una red tridimensional que da lugar a un gel (Y. Chen et al., 2021; Zarrintaj et al., 2020).

El P407 (Figura 17), es altamente hidrofílico debido a su alto contenido de óxido de etileno, lo que le permite disolverse bien en agua a temperaturas bajas. A medida que la temperatura aumenta, los enlaces de hidrógeno entre las cadenas de PEO y las moléculas de agua se debilitan, favoreciendo las interacciones hidrofóbicas entre los bloques de PPO y promoviendo la formación del gel (Y. Chen et al., 2021).

Esta característica de termogelificación es aprovechada en aplicaciones farmacéuticas y biomédicas, especialmente en sistemas de administración de fármacos, donde los geles formados son capaces de modificar su estado dependiendo de las condiciones de temperatura. Su capacidad para formar geles reversibles lo hace útil en una amplia gama de vías de administración, incluyendo la ocular, bucal, vaginal y cutánea (Y. Chen et al., 2021; Zarrintaj et al., 2020).

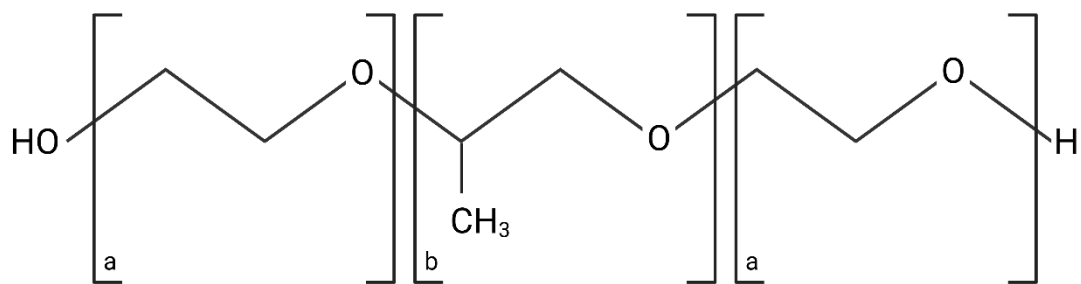
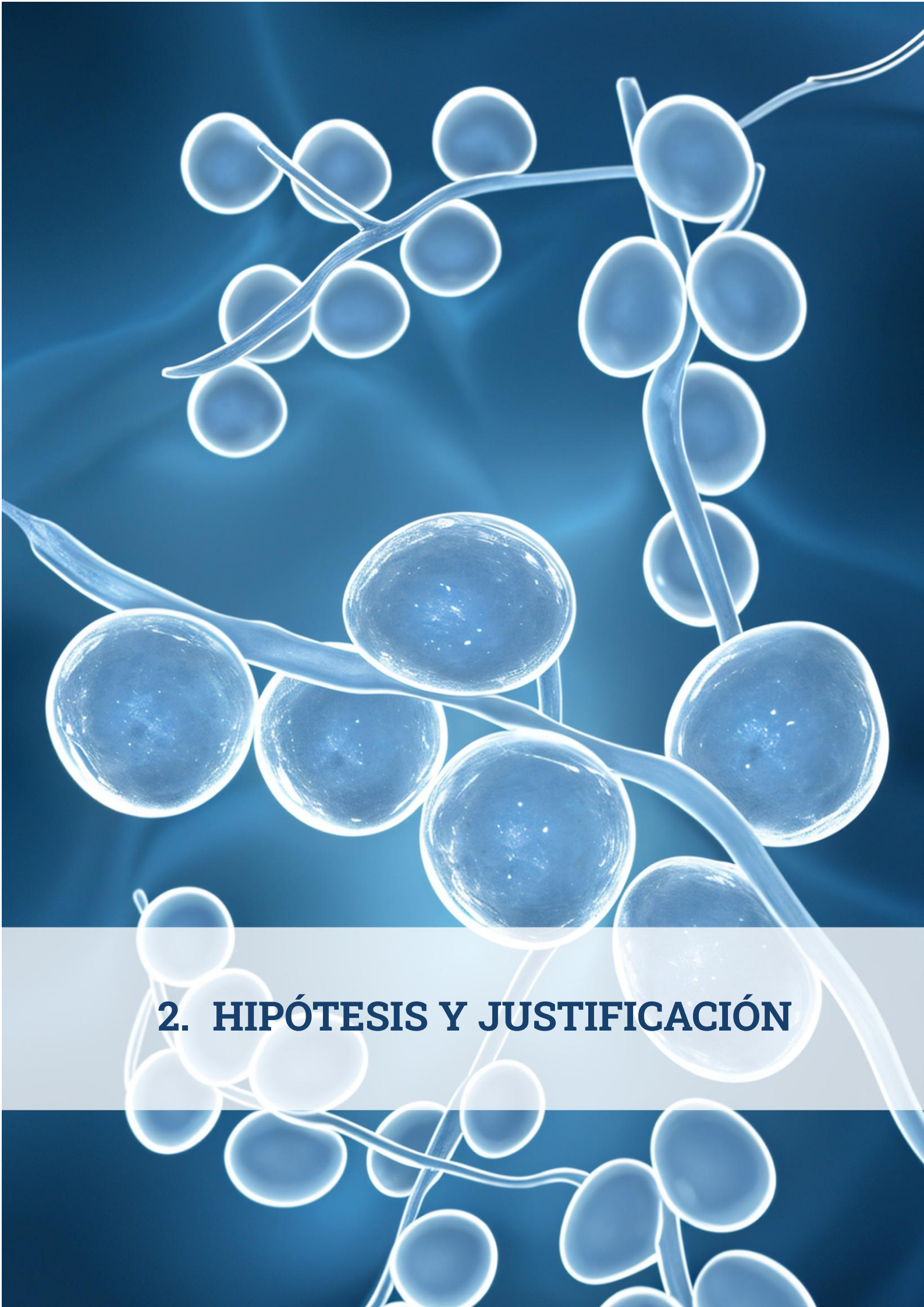


Figura 17. Estructura química del Pluronic® F-127: **a)** grupo PEO y **b)** grupo PPO.

- **Sinergia entre polímeros:** El chitosán, gracias a su carga positiva y propiedades mucoadhesivas, favorece la adhesión del gel a las superficies mucosas, incrementando la retención y biodisponibilidad del fármaco en el lugar de acción. Por su parte, el poloxamer, que tiene la capacidad de formar geles termorreversibles a través de una transición de fase inducida por temperatura, facilita el ajuste de la consistencia. La interacción sinérgica entre los componentes no solo mejora la formación y estabilidad de los sistemas de liberación de fármacos, sino que también optimiza la liberación controlada, lo que resulta en una mayor eficacia terapéutica en aplicaciones tópicas y en sistemas de administración para distintas vías.

A microscopic image of yeast cells and hyphae, rendered in a blue-tinted, high-contrast style. The cells are spherical and some are attached to thin, branching filamentous structures (hyphae). The background is a deep blue with a subtle, wavy texture.

2. HIPÓTESIS Y JUSTIFICACIÓN

La creciente resistencia a los fármacos antifúngicos ha alarmado a la comunidad médica y científica, especialmente en infecciones causadas por *C. albicans* (Fisher et al., 2022; Lockhart et al., 2023). Este microorganismo, que forma parte de nuestra microbiota normal, puede convertirse en un patógeno oportunista en situaciones de inmunosupresión, como ocurre con los ancianos, diabéticos o aquellos pacientes sometidos a tratamientos prolongados con antibióticos, quimioterapia o radioterapia. Las infecciones mucocutáneas resultantes no solo afectan la salud física, sino que también impactan negativamente en la calidad de vida de los pacientes.

A pesar de la amplia gama de medicamentos disponibles para tratar infecciones fúngicas, muchos presentan múltiples desventajas. En el caso de las infecciones oculares, las formulaciones tópicas, como colirios y pomadas antifúngicas, tienden a causar irritación ocular, desencadenando efectos secundarios como enrojecimiento, prurito y ardor persistente. Ingredientes activos como la natamicina y el voriconazol, aunque efectivos contra diversas especies fúngicas, pueden provocar molestias adicionales, como visión borrosa y sensación de cuerpo extraño en el ojo, afectando la adherencia al tratamiento (Mellado et al., 2013). Además, y como se ha comentado anteriormente, la natamicina no está comercializada en España, por lo que su uso debe ser autorizado como medicamento extranjero conforme al Real Decreto 1015/2009, que regula la disponibilidad de medicamentos en situaciones especiales.

Por otra parte, los conservantes utilizados, como el cloruro de benzalconio, están vinculados a problemas de toxicidad. Este compuesto, empleado por sus propiedades antimicrobianas y estabilizadoras, puede deteriorar la barrera epitelial corneal, aumentando la sensibilidad ocular, la sequedad y la inflamación. Su uso prolongado puede causar daños acumulativos en la superficie ocular, contribuyendo al desarrollo de queratopatía tóxica, un efecto adverso potencialmente grave que compromete la salud ocular (Goldstein et al., 2022). Además, la exposición repetida a fármacos como la natamicina y el voriconazol, puede fomentar la aparición de resistencia fúngica, reduciendo la eficacia del tratamiento y complicando el manejo de infecciones recurrentes o persistentes (C. Yang et al., 2024).

De manera similar, en el tratamiento de la mucosa oral, una de las principales desventajas de las formulaciones es que deben aplicarse varias veces al día y durante largos periodos, lo que dificulta la adherencia y el cumplimiento terapéutico. La frecuencia de aplicación requerida, sumada a la incomodidad que genera la interrupción constante de las actividades diarias para administrarlos, puede llevar a que los pacientes omitan dosis, comprometiendo así la eficacia del tratamiento. Otro inconveniente significativo es el sabor desagradable, especialmente problemático en pacientes pediátricos o adultos con sensibilidades al gusto. En particular, el miconazol y la nistatina, en sus formulaciones en gel o enjuagues bucales, pueden dejar un regusto amargo o metálico en la boca (Lyu et al., 2016).

Estas barreras no son exclusivas de estos fármacos, sino que deben considerarse en cualquier formulación diseñada para la mucosa oral. Hasta el momento no existen formulaciones de CSP desarrolladas específicamente para la aplicación bucal. Esto representa un desafío, ya que podrían surgir limitaciones similares a las observadas con otros antifúngicos orales. Por ello, es fundamental diseñar estrategias que minimicen estos inconvenientes, optimizando la adherencia y mejorando la experiencia del paciente mediante modificaciones en la forma farmacéutica o el uso de agentes enmascaradores del sabor.

Otro aspecto a considerar es la presencia de determinados excipientes, como los azúcares o edulcorantes, que se incluyen en muchas formulaciones antifúngicas para mejorar la palatabilidad del fármaco. En el caso de los enjuagues bucales o geles, se utilizan compuestos como la sacarosa o la sacarina sódica para hacer que el tratamiento sea más aceptable, especialmente en pacientes pediátricos. Si bien el uso de azúcares puede generar preocupaciones sobre el aumento del riesgo de caries dental y la alteración de la microbiota bucal (Hou et al., 2022; Winning et al., 2021), su inclusión sigue siendo una estrategia útil para garantizar la aceptación en poblaciones reacias a la administración de tratamientos antifúngicos debido al sabor. No obstante, se debe considerar el equilibrio entre la palatabilidad y los efectos a largo plazo de estos excipientes, buscando minimizar los riesgos asociados.

Por último, el inconveniente de mantener las formulaciones en la boca durante el tiempo necesario para garantizar su efectividad sigue siendo un desafío, independientemente de si se trata de enjuagues, jarabes o geles. En el mercado, las opciones disponibles incluyen principalmente suspensiones orales, como la nistatina, y polvo para suspensión oral, como es el caso del fluconazol, sin que se encuentren geles antifúngicos o pastas grasas específicamente formuladas para uso bucal. Si bien las formulaciones diseñadas en este estudio podrían generar incomodidad al requerir un mínimo tiempo de permanencia en la cavidad oral, la selección de ciertos excipientes podría influir en su comportamiento, optimizando su efectividad y tolerabilidad. Minimizar la molestia del paciente sigue siendo un objetivo clave para favorecer la adherencia al tratamiento y mejorar los resultados clínicos.

En cuanto a los tratamientos habituales para las infecciones vulvovaginales, como los óvulos o cremas antifúngicas, suelen administrarse una vez al día, preferiblemente por la noche, durante un periodo de 2 a 5 días. Sin embargo, su efectividad puede verse reducida por diversos factores. Por ejemplo, el flujo vaginal y la postura vertical del cuerpo pueden provocar la salida parcial del producto antes de que pueda ejercer su acción. Esto disminuye la concentración local del principio activo y prolonga el tiempo de recuperación (Palmeira-de-Oliveira et al., 2015).

Además de los inconvenientes asociados a la administración, ciertos principios activos, como el clotrimazol, pueden ocasionar efectos adversos locales. Entre estos efectos se incluyen la irritación, el ardor, el prurito o la inflamación en la zona de aplicación, especialmente en personas con piel sensible o predisposición a reacciones alérgicas (Andersen, 2001; Taudorf et al., 2019). Este problema es significativo porque el clotrimazol, el fármaco más frecuentemente prescrito debido a su amplio espectro antifúngico, presenta limitaciones. Su uso prolongado no solo provoca reacciones adversas ya mencionadas, sino que también conlleva riesgos de toxicidad (Zhao et al., 2021).

Es relevante señalar que ciertas poblaciones, como los pacientes inmunocomprometidos o aquellos con diabetes mellitus, presentan una mayor prevalencia de infecciones causadas por especies de *Candida* no albicans, como *C. glabrata* (Vitiello et al., 2023). Estas especies suelen ser resistentes o menos sensibles al clotrimazol y otros antifúngicos tópicos, complicando el manejo clínico. En estos casos, los tratamientos convencionales pueden ser ineficaces, requiriéndose un enfoque terapéutico más especializado.

Finalmente, los tratamientos tópicos para la piel también pueden provocar efectos secundarios como irritación, sequedad, dermatitis de contacto y ardor en la piel. El ketoconazol, aunque eficaz, tiene un perfil de efectos secundarios considerable, incluyendo erupciones cutáneas, eritema y, en casos más severos, reacciones alérgicas (Zhao et al., 2021). La terbinafina, por otro lado, puede causar descamación y decoloración de la piel. Estos efectos adversos varían según el tipo de piel y la duración del tratamiento. Además, el uso prolongado puede contribuir a la resistencia fúngica y aumentar el riesgo de efectos secundarios (Mejías Manzano et al., 2019). Este fenómeno se observa con mayor frecuencia en tratamientos subóptimos o cuando los pacientes no completan el tratamiento, lo que facilita el desarrollo de mecanismos de resistencia en los hongos y reduce la efectividad de las terapias a largo plazo.

Otro factor relevante es el costo y la accesibilidad de algunos de estos productos. Aunque las cremas y geles antifúngicos están disponibles en varias formulaciones comerciales, algunos pueden ser costosos o difíciles de encontrar en ciertas regiones o países. Esto puede representar una barrera adicional para los pacientes, dificultando la adherencia al tratamiento y reduciendo la probabilidad de alcanzar una curación completa. En ciertos casos, la falta de adherencia o el uso incorrecto del tratamiento puede derivar en infecciones recurrentes o crónicas, lo que aumenta la necesidad de enfoques terapéuticos más intensivos y complejos (Kneale et al., 2016; Vitiello et al., 2023).

En este contexto, la CSP surge como una alternativa prometedora en el tratamiento de infecciones mucocutáneas. Este fármaco ofrece ventajas significativas frente a los tratamientos convencionales, gracias a su mecanismo de acción, que se basa en la inhibición de la síntesis de la pared celular fúngica a través de la enzima β -1,3-D-glucano

sintasa. Este enfoque es superior al de otros porque, al actuar específicamente sobre la pared celular de los hongos, la CSP logra una acción fungicida efectiva sin afectar las células humanas, que carecen de pared celular. Esto no solo reduce el riesgo de efectos secundarios, sino que también permite combatir diversas especies de *Candida*, incluyendo cepas resistentes a otros antifúngicos, convirtiéndola en una valiosa opción en el tratamiento de infecciones fúngicas compleja.

Otra ventaja importante es su perfil de seguridad. Aunque no se han realizado estudios previos sobre su uso en tratamientos tópicos para infecciones mucocutáneas, la experiencia clínica acumulada en su administración intravenosa sugiere que la CSP generalmente presenta un menor riesgo de efectos secundarios adversos en comparación con algunos tratamientos tópicos convencionales, que pueden causar irritación o reacciones alérgicas. Este aspecto es particularmente relevante en el tratamiento de infecciones mucocutáneas, donde la tolerancia a los medicamentos es crucial para garantizar la adherencia. Además, la formulación y el uso de la CSP en estas vías pueden ofrecer una nueva alternativa para mejorar la seguridad y eficacia en el manejo de estas infecciones.

Desde la perspectiva de la formulación, la CSP tiene el potencial de ser utilizada en sistemas de administración tópica, lo cual es innovador, ya que es la primera vez que se formula para este uso. Estas formulaciones permitirían una buena biodisponibilidad en los tejidos afectados. A diferencia de otros antifúngicos tópicos, la CSP podría ofrecer una acción más específica contra infecciones fúngicas.

Dadas las dificultades enumeradas anteriormente, se hace necesario realizar un nuevo enfoque en el tratamiento con antifúngicos tópicos. En este sentido, este trabajo de investigación se centra en el desarrollo de formulaciones con CSP, con objeto de mejorar la eficacia del tratamiento de infecciones fúngicas mucocutáneas. Actualmente en España, según la Central de Información de Medicamentos (CIMA), solo se encuentran registradas y autorizadas por la AEMPS, formulaciones con CSP para perfusión. Estos medicamentos, clasificados como medicamentos de uso hospitalario y dada su vía de administración, solo pueden ser administrados por profesionales sanitarios. Sin embargo, las vías de administración propuestas en este trabajo engloban, colirios, hidrogeles, enjuagues bucales y una pasta grasa o ungüento, orientadas a optimizar la biodisponibilidad del fármaco en los tejidos afectados. Incorporando, además, excipientes con propiedades terapéuticas y características fisicoquímicas adecuadas que no solo vehiculicen el fármaco de manera eficiente, sino que también proporcionen efectos beneficiosos adicionales como propiedades antiinflamatorias o antimicrobianas. Por otro lado, este enfoque abre la puerta para evaluar otros antifúngicos del mismo o distintos grupos, permitiendo en un futuro ampliar las alternativas terapéuticas

El enfoque de estas formulaciones se centra en mejorar la biodisponibilidad y la concentración del fármaco en las áreas afectadas, permitiendo una administración orientada a las características específicas de cada tejido y con menos propensión a causar efectos adversos. A partir de esta mejora, se espera reducir el tiempo de exposición necesario para obtener los efectos terapéuticos, lo que minimizaría el riesgo de diseminación sistémica del patógeno y la aparición de resistencias. Además de aumentar la efectividad del tratamiento, este enfoque también busca simplificar su administración, facilitando un mayor cumplimiento por parte de los pacientes. Simplificar la administración podría permitir el cambio de la vía intravenosa a una tópica, lo que posibilitaría la administración ambulatoria del medicamento y eliminaría la necesidad de intervención de personal médico especializado. Esto reduciría el consumo de recursos, evitaría estancias prolongadas en el hospital y disminuiría el riesgo de comorbilidades asociadas.

A microscopic image of yeast cells and hyphae, rendered in a blue-tinted, semi-transparent style. The cells are spherical and some are connected by thin, branching structures. The background is a dark blue gradient.

3. OBJETIVOS Y PLAN DE ESTUDIO

El principal objetivo de este proyecto de tesis doctoral ha sido desarrollar y evaluar diversas formulaciones de CSP de administración tópica para el tratamiento de infecciones fúngicas mucocutáneas.

Para ello los objetivos específicos serán el diseño, desarrollo y caracterización de diferentes formulaciones con CSP para el tratamiento de:

1. Queratitis fúngica, mediante el empleo de colirios e hidrogeles.
2. Candidiasis oral secundaria a quimioterapia o mucositis oral inducida por radioterapia, empleando enjuagues bucales, hidrogeles y una pasta grasa o ungüento.
3. Candidiasis vulvovaginal, con el uso hidrogeles.
4. Candidiasis cutánea, utilizando hidrogeles.

De acuerdo con estos principios, a continuación, se presentan los aspectos clave de la planificación del trabajo. La elección de cada uno de ellos dependerá de las particularidades y propiedades de cada formulación:

- Conocer las estrategias de tratamiento actuales para el tratamiento de infecciones fúngicas en mucosas y piel.
- Crear y validar un método cuantitativo eficiente y rápido para el análisis de la CSP, siguiendo las directrices establecidas en la guía ICH Q2(R2), con el fin de asegurar su fiabilidad y precisión como técnica analítica de referencia en las primeras etapas del desarrollo de las formulaciones en estudio.
- Estudiar y seleccionar de manera cualitativa y cuantitativa los componentes necesarios para las diferentes formulaciones en estudio más adecuados a las distintas mucosas y piel.
- Optimizar el método de elaboración de cada una de las formulaciones.
- Caracterizar fisicoquímicamente las formulaciones respecto a su: pH, morfología, porosidad, propiedades eléctricas superficiales, propiedades termosensibles, espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier.
- Estudiar las propiedades reológicas de las diferentes formulaciones.
- Analizar la capacidad de extensibilidad y extrusión de las formulaciones.
- Estudiar *ex vivo* la hidratación del ojo, mucosa bucal y piel.
- Estudiar *ex vivo* la pérdida de agua a través del ojo (TOWL; del inglés transocular water loss), la mucosa bucal (TMWL; del inglés transmucosal water loss) y la piel (TEWL; del inglés transepidermal water loss).
- Evaluar la cinética de liberación de la CSP desde las formulaciones *in vitro*.
- Valorar la capacidad de permeación y retención de la CSP a nivel *ex vivo* tras la aplicación de las formulaciones propuestas en mucosa porcina y piel humana.
- Determinar las propiedades mucoadhesivas de las formulaciones.
- Valorar la idoneidad de las formulaciones en estudio tras su aplicación *ex vivo* en mucosa porcina y piel humana mediante estudios histológicos.

- Evaluar *in vitro* la tolerancia y propiedades irritantes de las formulaciones oculares usando el método de la membrana corioalantoidea del embrión de gallina (HET-CAM; por sus siglas en inglés Hen's Egg Test – Chorioallantoic Membrane).
- Estudiar *in vitro* la eficacia antifúngica de las formulaciones.

A microscopic image of yeast cells, likely Saccharomyces cerevisiae, showing individual cells and chains of cells. The cells are spherical and have a distinct cell wall. The background is a deep blue with some lighter blue, wavy patterns. A horizontal white band is present across the middle of the image, containing the section header.

4. RESULTADOS

Artículo 1

Caspofungin-Loaded Formulations for Treating Ocular Infections Caused by *Candida* spp

«Formulaciones cargadas con caspofungina para el tratamiento de infecciones oculares causadas por *Candida* spp»

Noelia Pérez-González, María J. Rodríguez-Lagunas, Ana C. Calpena-Campmany, Nuria Bozal-de Febrer, Lyda Halbaut-Bellowa, Mireia Mallandrich and Beatriz Clares-Naveros

Gels

2023, 9(4), 348

<https://doi.org/10.3390/gels9040348>

eISSN	2310-2861
Editorial	MDPI (Multidisciplinary Digital Publishing Institute)
Factor de impacto	5,0
Categoría	Polymer Science
Special Issue	Recent Advances in Gels Engineering for Drug Delivery
Posición	14/95
Cuartil	Q1

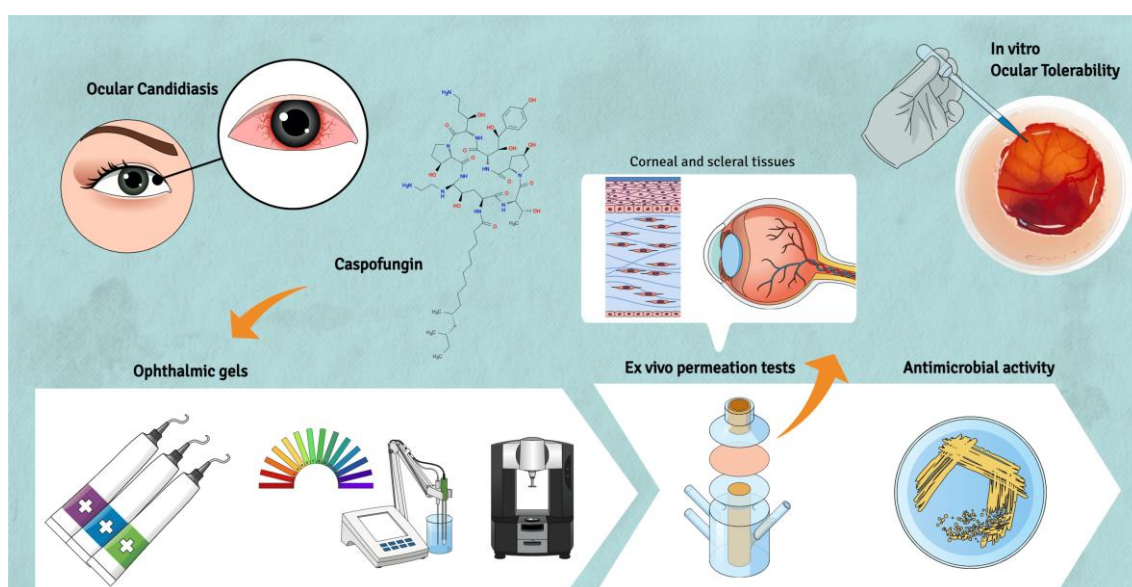
Resumen

La queratitis fúngica es una causa importante de ceguera corneal a nivel mundial. El tratamiento incluye antibióticos, siendo la natamicina el más utilizado; sin embargo, esta afección es difícil de tratar, por lo que se requieren terapias alternativas. Las formulaciones que gelifican *in situ* representan una alternativa prometedora, ya que combinan las ventajas de los colirios con las de los ungüentos. Este estudio se diseñó para desarrollar y caracterizar tres formulaciones que contienen 0,5 % de caspofungina (CSP): CSP-O1, CSP-O2 y CSP-O3. La CSP es un antifúngico eficaz contra una amplia variedad de hongos, mientras que el Poloxámero 407 (P407) es un polímero de origen sintético capaz de formar geles biocompatibles, biodegradables, altamente permeables y termorreversibles.

El estudio de estabilidad a corto plazo mostró que las formulaciones se conservan mejor a 4°C, y el análisis reológico reveló que solo CSP-O3 fue capaz de gelificar *in situ*. Los estudios de liberación *in vitro* indicaron que CSP-O1 libera la CSP más rápidamente, mientras que los estudios de permeación *in vitro* mostraron que CSP-O3 fue la formulación con mayor permeabilidad. El estudio de tolerancia ocular demostró que ninguna de las formulaciones causó irritación ocular, aunque CSP-O1 redujo la transparencia corneal. Los resultados histológicos indicaron que las formulaciones son adecuadas para su uso, excepto CSP-O3, que indujo leves cambios estructurales en la esclera.

Todas las formulaciones mostraron actividad antifúngica. En vista de los resultados obtenidos, estas formulaciones podrían ser candidatas prometedoras para el tratamiento de la queratitis fúngica.

Graphical abstract



Caspofungin-Loaded Formulations for Treating Ocular Infections Caused by *Candida* spp

Noelia Pérez-González¹, María J. Rodríguez-Lagunas^{2,3}, Ana C. Calpena-Campmany^{4,5}, Nuria Bozal-de Febrer⁶, Lyda Halbaut-Bellowa^{4,5}, Mireia Mallandrich^{4,5,*} and Beatriz Clares-Naveros^{1,5,7}

¹ Department of Pharmacy and Pharmaceutical Technology, Faculty of Pharmacy, Campus of Cartuja, University of Granada, 18071 Granada, Spain; noeliaperez93@correo.ugr.es (N.P.-G.); beatrizclares@ugr.es (B.C.-N.)

² Department of Biochemistry & Physiology, Faculty of Pharmacy & Food Sciences, Universitat de Barcelona (UB), 08028 Barcelona, Spain

³ Nutrition and Food Safety Research Institute (INSA-UB), 08921 Santa Coloma de Gramenet, Spain

⁴ Department of Pharmacy and Pharmaceutical Technology and Physical Chemistry, Faculty of Pharmacy and Food Sciences, Universitat de Barcelona (UB), 08028 Barcelona, Spain

⁵ Institute of Nanoscience and Nanotechnology (IN2UB), Universitat de Barcelona (UB), 08028 Barcelona, Spain

⁶ Department of Biology, Healthcare and the Environment, Faculty of Pharmacy and Food Sciences, Universitat de Barcelona (UB), 08028 Barcelona, Spain

⁷ Biosanitary Institute of Granada (ibs.GRANADA), 18012 Granada, Spain

* Correspondence: mireia.mallandrich@ub.edu

Abstract

Fungal keratitis causes corneal blindness worldwide. The treatment includes antibiotics, with Natamycin being the most commonly used; however, fungal keratitis is difficult to treat, so alternative therapies are needed. In situ gelling formulations are a promising alternative; this type of formulation has the advantages of eye drops combined with the advantages of ointments. This study was designed to develop and characterize three formulations containing 0.5% CSP: CSP-O1, CSP-O2, and CSP-O3. CSP is an antifungal drug that acts against a diverse variety of fungi, and Poloxamer 407 (P407) is a polymer of synthetic origin that is able to produce biocompatible, biodegradable, highly permeable gels and is known to be thermoreversible. Short-term stability showed that formulations are best stored at 4 °C, and rheological analysis showed that the only formulation able to gel in situ was CSP-O3. *In vitro* release studies indicated that CSP-O1 releases CSP most rapidly, while *in vitro* permeation studies showed that CSP-O3 permeated the most. The ocular tolerance study showed that none of the formulations caused eye irritation. However, CSP-O1 decreased the cornea's transparency. Histological results indicate that the formulations are suitable for use, with the exception of CSP-O3, which induced slight structural changes in the scleral structure. All formulations were shown to have antifungal activity. In view of the results obtained, these formulations could be promising candidates for use in the treatment of fungal keratitis.

Keywords: caspofungin; ocular drug delivery; antifungal activity; ocular gels; poloxamer 407; ocular infection

1. Introduction

Ocular infections caused by fungi, bacteria, parasites, or other pathogens are one of the primary causes of blindness in the world, particularly in developing countries [1]. Most corneal ulcers are caused by fungal infections [2–4]. It has a high morbidity rate, as people who suffer from it are left with a high level of visual impairment. The most common pathogens are *Candida*, *Aspergillus*, and *Fusarium* spp. Fungal keratitis is very difficult to treat and is characterized by a poor response to antifungal treatment, requiring surgical intervention [5]. The standard treatment for establishing the diagnosis of fungal keratitis is a corneal scraping for microscopic examination and culture preparation. As soon as the diagnosis is confirmed, treatment with an antibiotic that covers the causative microorganism should be started without delay. Natamycin is the most widely used drug. However, it has not been shown to be effective in the treatment of keratomycosis. For this reason, voriconazole is a better alternative [6]. The current recommendation in the literature is to initiate biased antifungal therapy, with the treatment regimen being individualized according to the patient's response to therapy [7,8].

In the therapeutic arsenal, a limited number of eye drops with antifungal action are available for the treatment of fungal keratitis. This fact, coupled with the poor response to antifungal treatment, creates the need to develop new topical antifungal agents that are currently available intravenously [9].

A new family of antifungal drugs is now available: the echinocandins, of which caspofungin (CSP) is the most remarkable [10–12]. CSP is a semi-synthetic, water-soluble lipopeptide derived from a fermentation product of *Glarea lozoyensis*. The mechanism of action is to block the synthesis of (1,3)-D-glucan, an essential element of the cell wall of many fungal species [13–16]. CSP exhibits activity against a diverse range of fungi, with MIC₉₀ values in the range from 60 ng/mL to 2000 ng/mL [17,18]. Although clinically, CSP is administered intravenously, CSP eye drops have been reported to be effective for keratitis in rabbits [19,20] and in some patients [21–23]. The use of release systems for vaginal administration of CSP has already been reported [24]. The validity of CSP as an agent used to treat fungal keratitis is unknown, as no evidence is available on its ability to permeate into the aqueous humor (Figure 1) when administered topically [25].

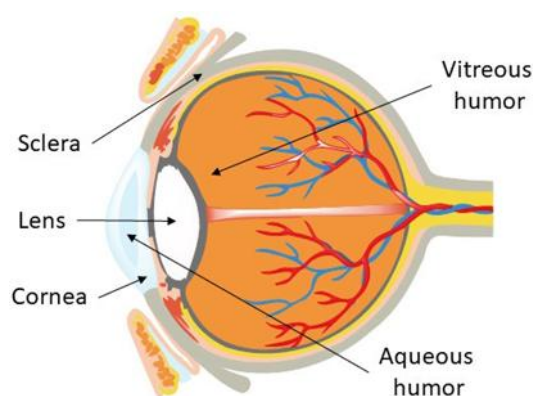


Figure 1. Anatomical structure of the eyeball.

The most commonly used method of topical administration of eye drugs is instillation. The eye drops have the disadvantage that they are easily washed out of the area as a result of tearing; they are retained for no more than 2 min, and the bioavailability of the active ingredients is less than 5% [26]. An alternative to increasing the contact time of the formulation is to increase the viscosity of the formulation, but this often leads to blurred vision in the case of ointments or lack of patient compliance. The strategy to resolve this problem is to develop preparations that will

gel in situ on contact with the eye and thus achieve a longer residence time [27]. These delivery systems combine the advantages of eye drops—reproducibility of the required dose, simplicity of administration and accuracy—and gels—longer contact time with the affected area [28]. Poloxamer 407 (P407) is a polymer of synthetic origin able to produce biocompatible, biodegradable, and highly permeable gels [29]. P407 is a hydrophilic nonionic surfactant and is formed by polypropylene oxide (PPO) as the core block and poly (ethylene oxide) (PEO) as flankers to form the PEO-PPO-PEO structure known to be thermoreversible in function of the concentration and the temperature employed [30]. The incorporation of CSP into the polymeric matrix of P407 will protect it from degradation, enhancing the therapeutic effect. In addition, P407 is capable of forming micelles that could provide the system with exceptional solubility [31].

In the present investigation, three topical ocular delivery systems of CSP for the treatment of fungal keratitis have been developed and optimized. One eye drop is based on physiological saline solution, and the rest are based on P407 in their composition, with the intention that it gels in situ on contact with the eye and increases bioavailability in the deep ocular tissue. All of them incorporate CSP at 0.5%. Short-term stability, rheological analysis, *in vitro* release, and permeation profiles were conducted. Ocular tolerance and corneal transparency studies have been carried out with the aim of demonstrating that none of the formulations developed causes eye irritation through tolerability. Histological and antifungal studies were also conducted.

2. Results and Discussion

2.1. Physicochemical Characterization

Table 1 reports the pH values obtained from the formulations freshly prepared (t_0) and after three weeks (t_{21}) stored at 4, 25, and 32°C. It could be noted that after three weeks, the pH values remained constant. No significant differences were recorded between the same formulation after storage at the different temperatures.

Table 1. pH values in formulations freshly prepared (t_0) and after three weeks (t_{21}), stored at 4, 25, and 37°C, and their visual appearance. Values represent the mean $\pm$ SD ($n = 3$).

Formulation	Temperature (°C)	pH values over time					Appearance at t_{21}
		pH t_0	pH t_3	pH t_7	pH t_{14}	pH t_{21}	
CSP-O1	4	6.60 $\pm$ 0.02	6.63 $\pm$ 0.03	6.59 $\pm$ 0.03	6.74 $\pm$ 0.02	6.76 $\pm$ 0.03	Passed
	25	6.81 $\pm$ 0.02	6.77 $\pm$ 0.03	6.71 $\pm$ 0.02	6.88 $\pm$ 0.02	6.75 $\pm$ 0.02	Failed
	32	6.56 $\pm$ 0.01	6.54 $\pm$ 0.01	6.44 $\pm$ 0.01	6.53 $\pm$ 0.01	6.44 $\pm$ 0.01	Failed
CSP-O2	4	6.73 $\pm$ 0.07	6.67 $\pm$ 0.02	6.84 $\pm$ 0.02	6.88 $\pm$ 0.03	6.84 $\pm$ 0.01	Passed
	25	6.86 $\pm$ 0.02	6.93 $\pm$ 0.04	6.78 $\pm$ 0.04	6.95 $\pm$ 0.04	6.80 $\pm$ 0.03	Passed
	32	6.62 $\pm$ 0.01	6.50 $\pm$ 0.01	6.36 $\pm$ 0.01	6.55 $\pm$ 0.02	6.31 $\pm$ 0.01	Failed
CSP-O3	4	6.56 $\pm$ 0.01	6.71 $\pm$ 0.01	6.70 $\pm$ 0.03	6.69 $\pm$ 0.09	6.55 $\pm$ 0.01	Passed
	25	6.72 $\pm$ 0.05	6.78 $\pm$ 0.01	6.75 $\pm$ 0.01	6.66 $\pm$ 0.01	6.43 $\pm$ 0.06	Passed
	32	6.72 $\pm$ 0.02	6.94 $\pm$ 0.01	6.86 $\pm$ 0.02	6.65 $\pm$ 0.04	6.48 $\pm$ 0.01	Failed

Freshly prepared samples (t_0) were transparent, and no precipitates were observed after 21 days. After three weeks, all samples maintained their initial appearance when stored at 4°C. CSP-O1 turned slightly yellow at 25 and 32°C. In contrast, both CSP-O2 and CSP-O3 maintained their initial appearance at 25°C but not at 32°C, turning slightly yellow.

The fact that samples CSP-O2 and CSP-O3 maintain their appearance at 4 and 25°C but not at 32°C may be due to the micelles formed by P407. P407 is known to be a thermoresistant polymer, and the micelles it forms can assemble and dissociate as a function of temperature [32–34]. At 32°C, they may dissociate into monomers and expose the CSP to degradation, resulting in formulations with a slight yellow color. The same may occur with CSP-O1, since this formulation

does not contain P407 and therefore leaves the CSP more exposed to possible degradation, hence the yellow color at 25 and 32°C.

Table 2 displays the rotational test readings of the formulations measured at 4 and 25°C to simulate cold and room temperature storage conditions, respectively, and 32°C to simulate eye application conditions.

The CSP-O1 (Figure 2A) and CSP-O2 (Figure 2B) formulations exhibited Newtonian behavior in all three thermal test conditions, as the flow curve profiles best fitted Newton's equation. The viscosity of CSP-O2 was slightly higher, due to the presence of 0.2% P407. The increase in temperature implied a decrease in viscosity for both formulations.

Table 2. Results of the rheological rotational testing of the formulations. Each value of viscosity represents the mean $\pm$ SD (n = 3).

Sample		CSP-O1			CSP-O2			CSP-O3		
Temperature (°C)		4	25	32	4	25	32	4	25	32
Rheological behaviour and model	Ramp Up	Newton r=0.9940	Newton r=0.9824	Newton r=0.9839	Newton r=0.9907	Newton r=0.9904	Newton r=0.9816	Newton r=0.9981	Cross r=0.9739	Cross r=0.9390
	Ramp Down	Newton r=0.9944	Newton r=0.9884	Newton r=0.9841	Newton r=0.9973	Newton r=0.9934	Newton r=0.9869	Newton r=1.0000	Cross r=0.9712	Cross r=0.9968
Viscosity at 50 s ⁻¹ (mPa·s)		1,032 $\pm$ 0.028	0,738 $\pm$ 0.026	0,592 $\pm$ 0.026	1,229 $\pm$ 0.032	0,806 $\pm$ 0.026	0,691 $\pm$ 0.031	20.50 $\pm$ 0.058	281.7 $\pm$ 13.87	4166 $\pm$ 32.72
Apparent Thixotropy		Absence	Absence	Absence	Absence	Absence	Absence	Absence	Presence	Presence

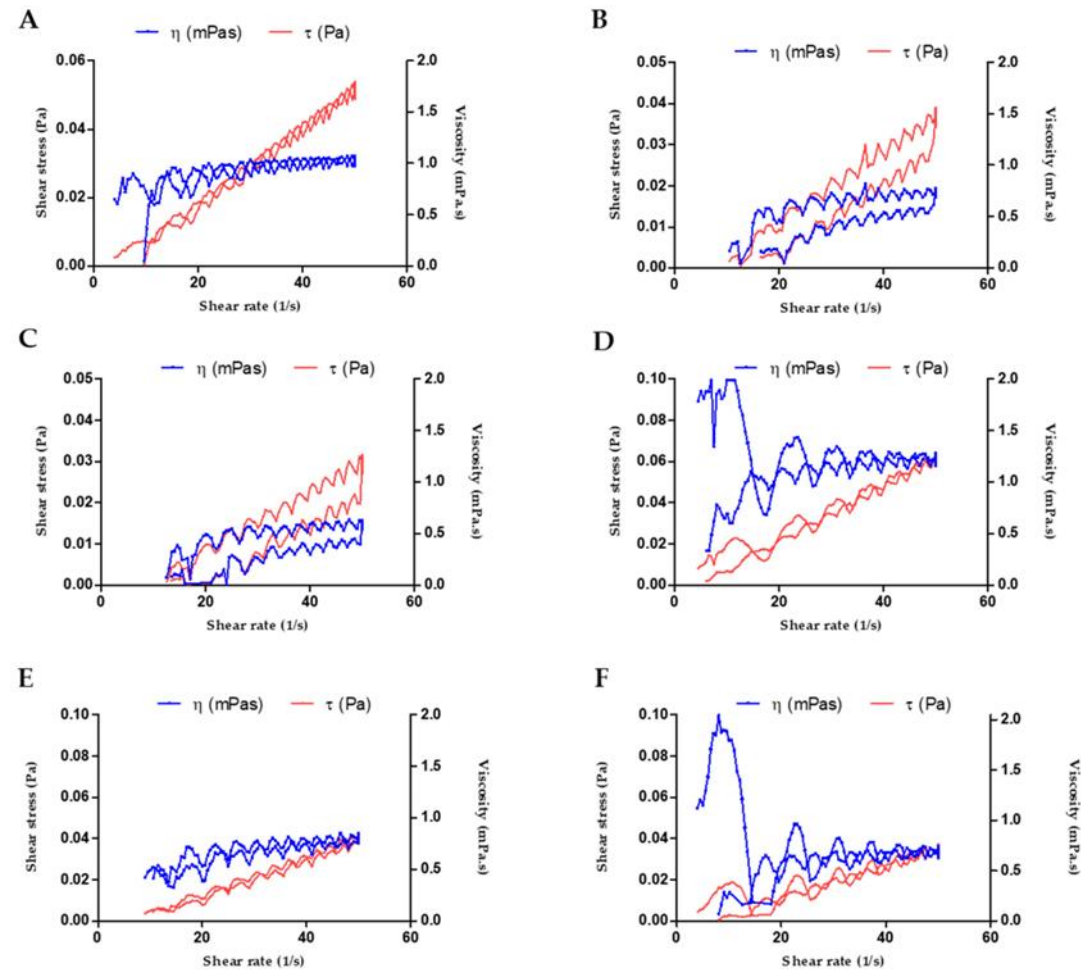


Figure 2. Cont.

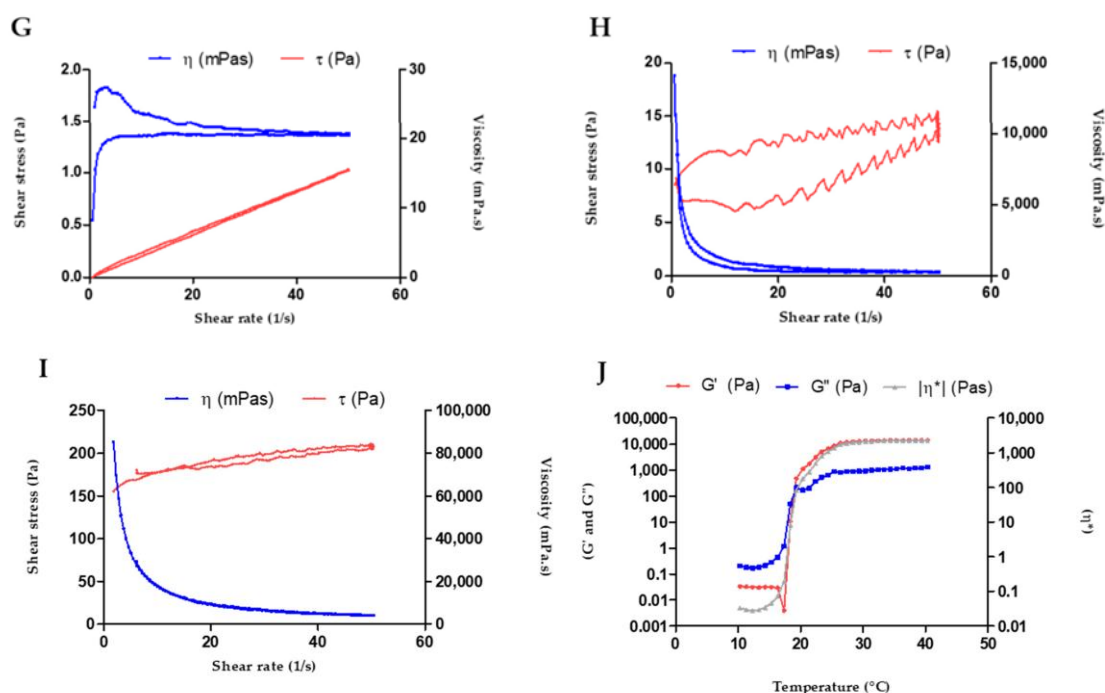


Figure 2. Flow and viscosity curves of samples: (A) CSP-O1 at 4°C; (B) CSP-O1 at 25°C; (C) CSP-O1 at 37°C; (D) CSP-O2 at 4°C; (E) CSP-O2 at 25°C; (F) CSP-O2 at 37°C; (G) CSP-O3 at 4°C; (H) CSP-O3 at 25°C; (I) CSP-O3 at 37°C; and (J) SOL-GEL temperature transition of CSP-O3 hydrogel.

In contrast, CSP-O3 (Figure 2C–E) is the clear example of a P407-based formulation: it behaves as a liquid at cold temperatures and as a gel at temperatures that are close to the temperature of the body [35]. The viscosity of the CSP-O3 hydrogel increased from 20.50 ± 0.056 mPa·s (SOL structure at 4°C) to 4166 ± 32.72 mPa·s (GEL structure at 32°C). In parallel, the flow curve of the CSP-O3 hydrogel exhibited Newtonian behavior at 4°C and a non-Newtonian character at 32°C, corresponding to a shear thinning (pseudoplastic) profile best described by the Cross equation, according to the change in the system structure.

Moreover, the CSP-O3 flow curve showed apparent thixotropic behavior at 25 and 32°C as the rheograms displayed a hysteresis loop. These rheological properties are suitable for ocular administration, as this in situ gelling ophthalmic drug delivery system contributes to the formation of a stable and uniform film covering the area of application and allowing the drug to diffuse through the matrix [36–38].

The results of the temperature sweep test that was carried out to investigate the in situ gelling of the poloxamer in the case of CSP-O3 gel are visualized in Figure 2F. The TSOL-GEL (where $G' = G''$) was about 19°C. This is the temperature at which the sample exhibits a change from a predominantly viscous behavior ($G'' > G'$) to a predominantly elastic one ($G' > G''$). This interesting gelling process leads to an increased residence time, which avoids the rapid elimination of the gel [39].

The Transform Fourier Infrared (FTIR) was performed to investigate any possible chemical interaction between the drug and the polymers. Figure 3 depicts the FTIR spectra for each formulation related to the CSP drug spectrum. No interaction between the polymer and CPS was observed.

2.2. Ocular Hydration (OH) Measurements

This project has described for the first time the parameter that measures the basal hydration values of ocular tissue *ex vivo* and after applying different formulations. Figure 4 shows the ocular

hydration (OH) results obtained after the application of the formulations to the corneal membrane (Figure 4A) and scleral membrane (Figure 4B).

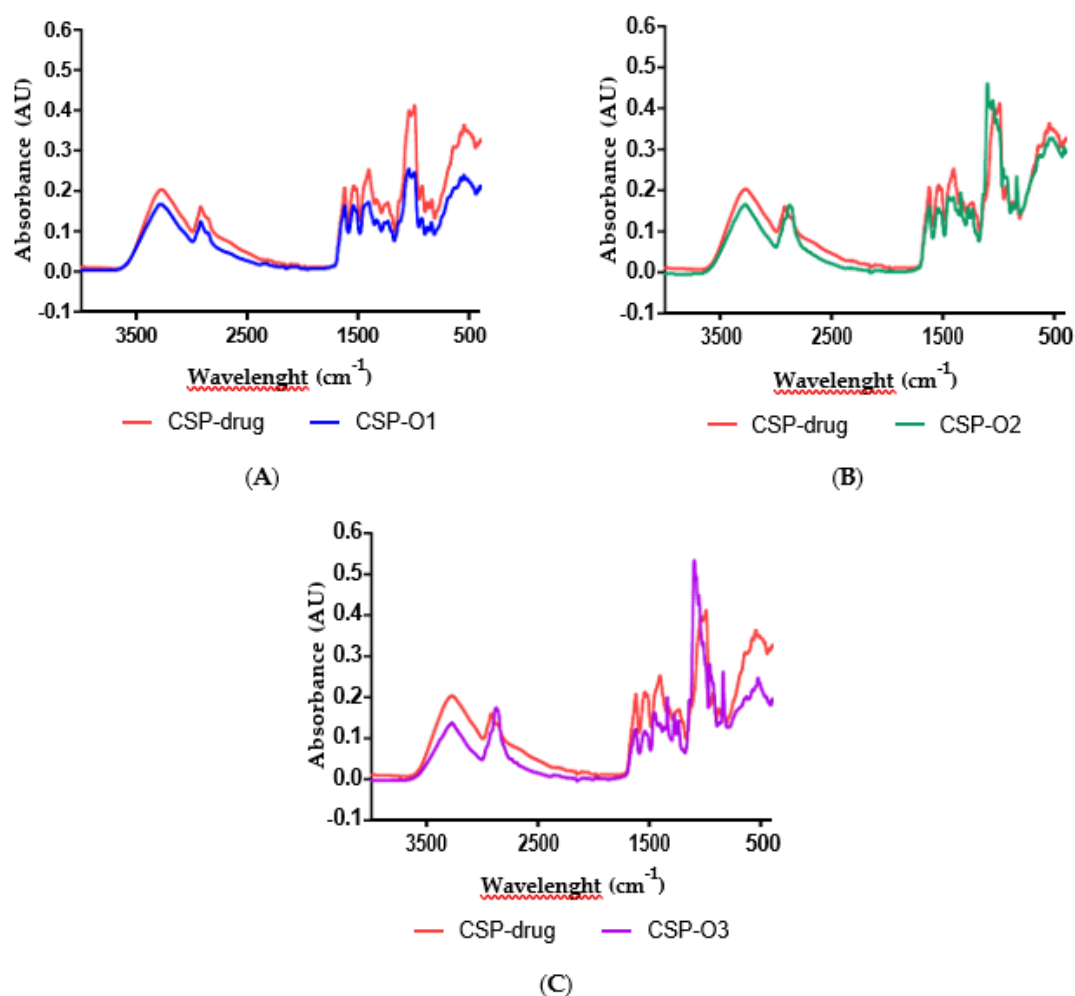


Figure 3. FTIR spectra of: (A) CSP drug vs. CSP-O1; (B) CSP drug vs. CSP-O2; and (C) CSP drug vs. CSP-O3.

Progressive dehydration was observed over the 2 h of monitoring, especially in the blank sclera. This is probably due to the fact that the measurements were carried out on *ex vivo* eyeballs, which do not retain moisture through tears and blinking as would in *vivo* eyes. The general tendency is that hydration is decreased in all cases, being more pronounced when CSP-O3 was applied to both corneal and scleral tissue. In scleral tissue, a marked dehydration of the tissue can be observed, a phenomenon that does not occur when the different formulations are applied. In this case, the hydration appears to have been maintained over time. In general terms, it can be said that CSP-O1 and CSP-O2 act to protect the cornea and sclera from dehydration.

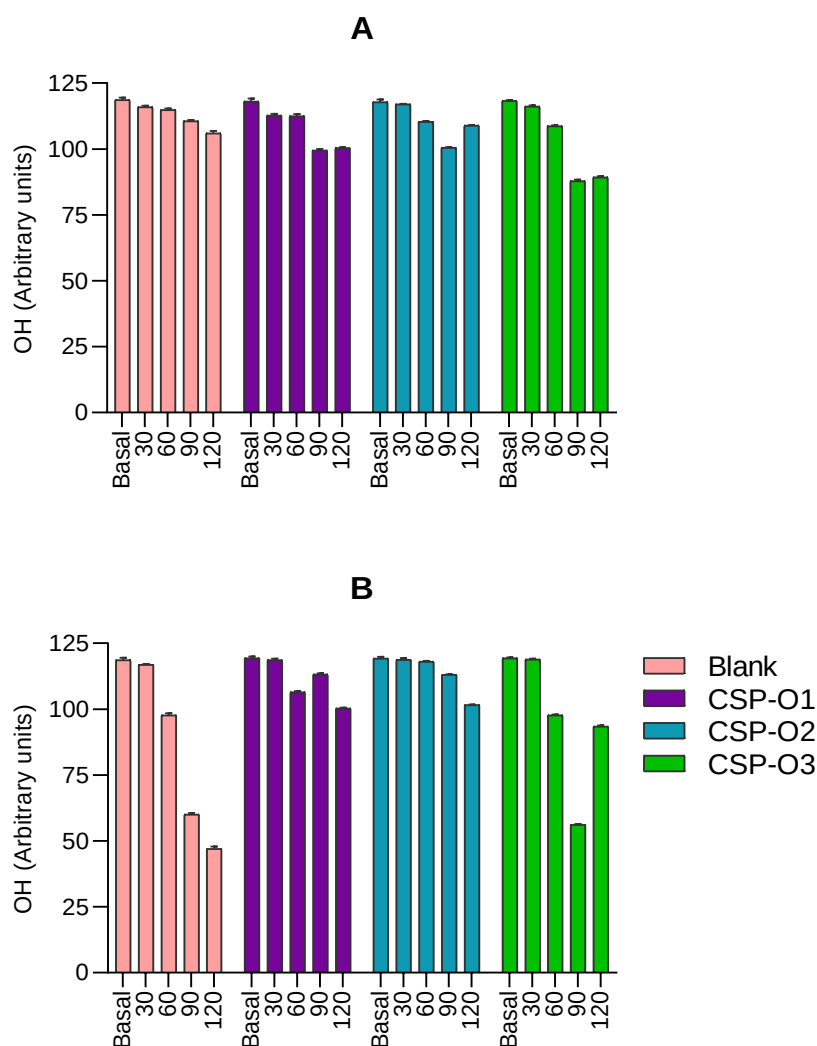


Figure 4. Ocular hydration values obtained after a two-hour application of the samples to (A) the corneal membrane and (B) the scleral membrane. Each value represents the mean $\pm$ SD ($n = 10$). All formulations at all times, with the exception of basal, show statistically significant differences ($p < 0.001$).

Baseline corneal and scleral values increase with time (2 h). When CSP-O1 and CSP-O3 were applied to the corneal tissue, a marked increase was observed in the first half hour with regard to the blank tissues. The increase is probably due to the water content in the formulations that moisten the tissue surfaces when applied. CSP-O1 showed similar TOWL values to the blank cornea and sclera, then decreased and increased again. The CSP- O2 formulation increased the values in the cornea, with some slight decreases observed between one and one and a half hours. All formulations showed similar behavior when applied to the scleral tissue, with lower TOWL results in CSP-O2.

In general, the values obtained for both tissues show that TOWL increases after being in contact with the formulations for 2 h.

2.3. Transocular Water Loss (TOWL) Measurements

Transocular water loss (TOWL) is a method based on the measurement of transepidermal water loss (TEWL) to determine the integrity of the barrier function of the skin. Similarly, TOWL could be used as a tool to evaluate the integrity of corneal and scleral tissue after application of different formulations. This is the first time that the parameter measures *ex vivo* baseline values

in porcine corneal and scleral tissue as well as values after application of CSP-loaded formulations. Figure 5 shows the values for TOWL in both corneal (Figure 5A) and scleral (Figure 5B) tissue after a two-hour application of the samples. The ocular dehydration resulted in increased Transocular Water Loss (TOWL), which measures water evaporation. When analyzing the application of the formulations to the cornea, it was observed that the increasing pattern of TOWL over time was modified in the early times post-application, especially the first 30 min, in which the TOWL values were higher than the blank, probably because of the water content in the formulations. Formulation CSP-O1 showed similar TOWL values to the blank cornea from 90 min on, and the same effect of the formulation was observed on the sclera. Regarding formulations CSP-O2 and CSP-O3, the content of pluronic in their composition suggests that the polymer would minimize the transocular water evaporation during the first 60 min regardless of pluronic concentration since both formulations exhibited a similar behavior on the cornea, whereas CSP-O3 presented a greater capacity in preventing the transocular water loss in the sclera than CSP-O2. This might be due to the structural differences between corneal and scleral tissue [40].

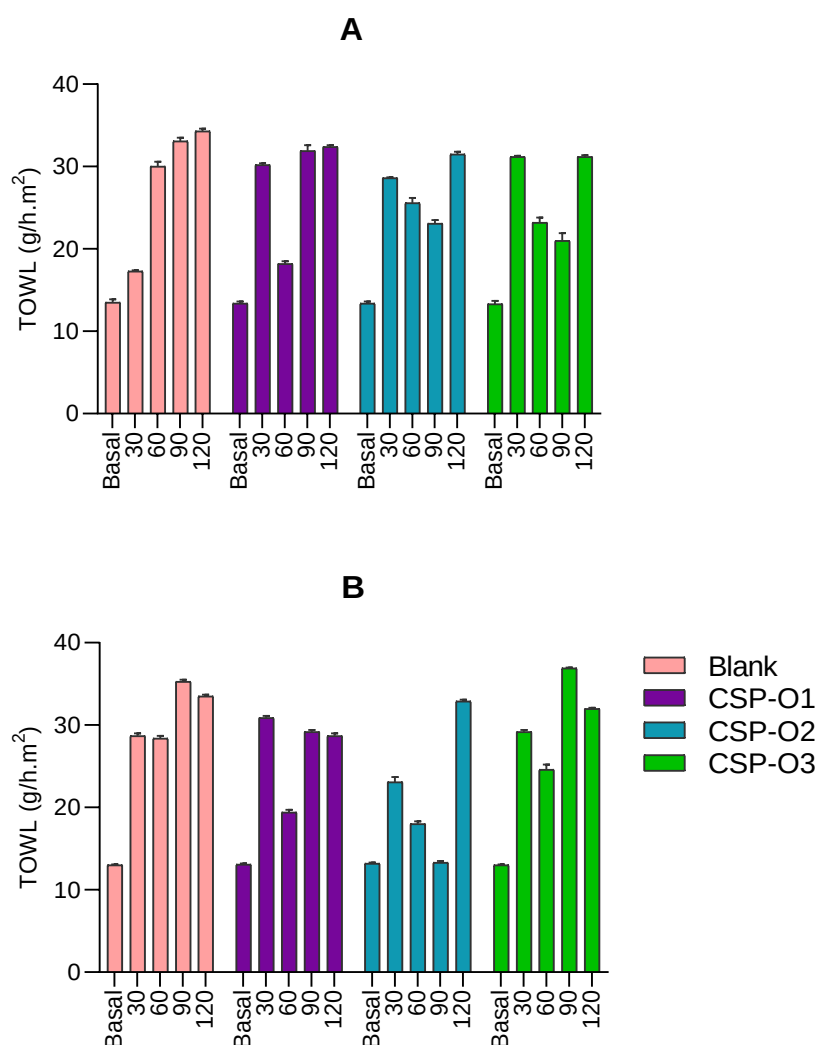


Figure 5. TOWL obtained after a two-hour application of the samples to (A) the corneal membrane and (B) the scleral membrane. Each value represents the mean $\pm$ SD ($n = 10$). All formulations at all times, with the exception of basal, show statistically significant differences ($p < 0.001$).

2.4. In Vitro Release and Kinetic Evaluation

The release profiles of formulations are shown in Figure 6. The fitting results revealed that the samples conformed to the one-site binding model, Equation (1):

$$Y = \frac{B_{max} \cdot X}{K_d + X} \quad (1)$$

where B_{max} is the maximum amount that can be released and K_d is the time needed to reach 50% of the drug released.

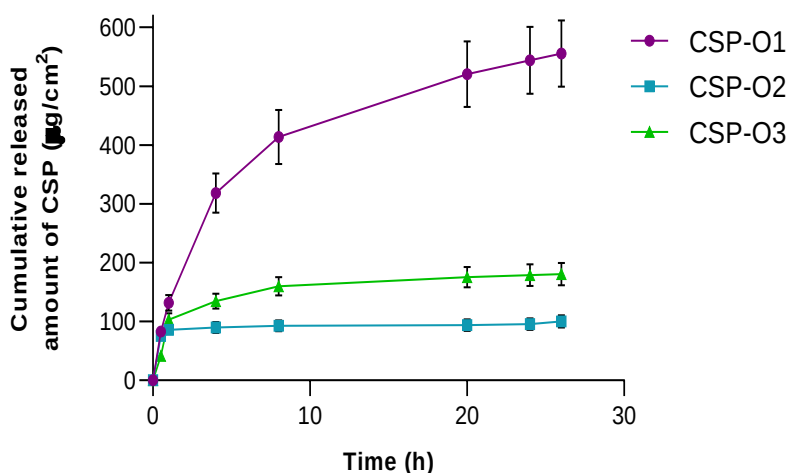


Figure 6. Cumulative amount released of CSP from formulations plotted against time. Data represents mean $\pm$ SD ($n = 5$).

In view of the results reported, it can be said that CSP-O1 releases CSP most rapidly, CSP-O3 is the second fastest releaser, and finally CSP-O2. During the first hour, all formulations show a fast release. This is followed by a slower release until the end of the test. Statistical analysis showed significant differences for the K_d value, which means that each formulation releases 50% of the drug in a different way.

Table 3 shows the values obtained for the model parameters, in addition to the values for the non-modelistic parameters such as the mean dissolution time (MDT, the mean dissolution time of CSP in the formulation throughout the process), the area under the curve (AUC, representing the amount of CSP released from the formulation), and the efficiency (E). CSP-O2 presented the highest MDT value, 21.7 ± 2.4 h, followed by the CSP-O3 formulation with a value of 18.7 ± 1.7 h, and at last CSP-O1 with a value of 6.1 ± 0.5 h. Based on these results, CSP-O2 would be the formulation that releases CSP the fastest, suggesting that it is the formulation that can provide the best bioavailability of the drug in ocular tissue. In terms of AUC values, the highest value corresponds to CSP-O1, $11,040.0 \pm 1087.0$ $\mu\text{g}/\text{cm}^2 \cdot \text{h}$, while the lowest value corresponds to CSP-O2, 2381.0 ± 248.0 $\mu\text{g}/\text{cm}^2 \cdot \text{h}$. Finally, the CSP-O1 formulation showed an E value of $76.5 \pm 7.1\%$, the CSP-O2 a value of $16.5 \pm 1.3\%$, and $28.2 \pm 2.6\%$ for CSP-O3.

Table 3. Modelistic parameters obtained after fitting the data to the best release model (one-site binding model) of the formulations and non-modelistic parameters. Values represent the mean $\pm$ SD ($n = 5$).

	One-site binding			Statistic
	CSP-O1 ¹	CSP-O2 ²	CSP-O3 ³	
Modelistic parameters				
B_{max} (μg/cm ²)	628.9 ± 18.2	95.9 ± 2.7	185.6 ± 14.3	*** 1 vs. 2 and 3; *** 2 vs. 3
K_d (h)	3.9 ± 0.4	0.1 ± 0.0	1.2 ± 0.5	*** 1 vs. 2 and 3; ** 2 vs. 3
Non-modelistic parameters				
AUC (μg/cm ² ·h)	11,040.0 ± 1,087.0	2,381.0 ± 248.0	4,068.0 ± 403.0	*** 1 vs. 2 and 3; ** 2 vs. 3
MDT (h)	6.1 ± 0.5	21.7 ± 2.4	18.7 ± 1.7	*** 1 vs. 2 and 3; * 2 vs. 3
E (%)	76.5 ± 7.1	16.5 ± 1.3	28.2 ± 2.6	*** 1 vs. 2 and 3; ** 2 vs. 3

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

All formulations are able to release the drug, so permeation of the drug through the corneal and scleral membranes should not be limited.

2.5. Ex Vivo Permeation of CSP through Ocular Mucosa

Figure 7 shows the permeation profiles of all formulations when they are passed through the corneal membrane (Figure 7A) and scleral membrane (Figure 7B). The CSP permeation trend was different in both tissues. The CSP permeation tendency was different in both tissues. In the cornea, the formulations fit a one-site binding release profile. CSP-O3 permeated the most, followed by CSP-O1, and finally CSP-O2. The permeation parameters were calculated in the linear section, i.e., in the first hour, and can be seen in Table 4.

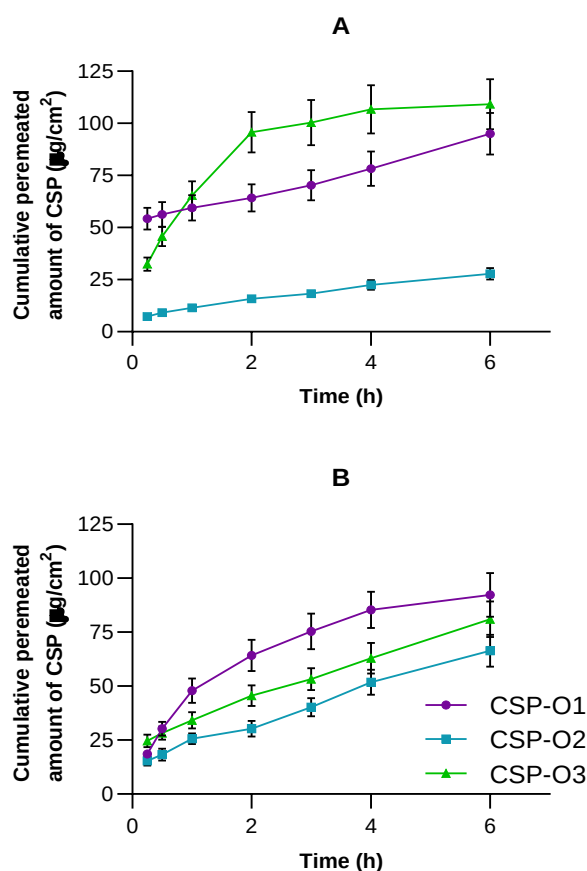


Figure 7. Cumulative amount of CSP permeated (μg) through (A) the corneal membrane and (B) the scleral membrane upon application of CSP formulations. Each value represents the mean $\pm$ SD ($n = 6$).

Table 4. Estimated permeation and retention parameters of CSP formulations on corneal and scleral membranes in the section where the curves are linear (first hour). Values are reported as the mean $\pm$ SD ($n = 6$). J_{sup} : flux normalized by surface; C_0 : initial concentration in the donor compartment; K_p : permeability constant; A_6 : cumulatively permeated amount of CSP at 6 h; Q_r : amount of CSP retained in the skin.

Corneal membrane	CSP-O1 ¹	CSP-O2 ²	CSP-O3 ³	Statistic
J_{sup} ($\mu\text{g}/\text{h}/\text{cm}^2$)	6.75 ± 0.32	5.46 ± 0.78	43.25 ± 3.49	*** 3 vs 1 and 2
C_0 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	5,000	5,000	5,000	-
K_p (10^{-3} cm/h)	1.35 ± 0.06	1.09 ± 0.16	8.65 ± 0.69	* 1 vs 3; *** 2 vs 1 and 3
A_6 ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	94.99 ± 9.94	27.86 ± 2.84	109.14 ± 12.04	* 1 vs 3; *** 2 vs 1 and 3
Q_r ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	28.83 ± 2.81	11.47 ± 1.79	7.03 ± 0.75	** 2 vs 3; *** 1 vs 2 and 3
Scleral membrane	CSP-O1 ¹	CSP-O2 ²	CSP-O3 ³	Statistic
J_{sup} ($\mu\text{g}/\text{h}/\text{cm}^2$)	38.40 ± 2.83	13.78 ± 0.81	12.73 ± 0.73	*** 1 vs 2 and 3
C_0 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	5,000	5,000	5,000	-
K_p (10^{-3} cm/h)	7.68 ± 0.56	2.76 ± 0.16	2.55 ± 0.15	*** 1 vs 2 and 3
A_6 ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	92.32 ± 10.23	66.40 ± 7.32	80.99 ± 8.23	* 2 vs 3; *** 1 vs 2
Q_r ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	48.79 ± 5.23	30.61 ± 3.47	20.09 ± 2.43	*** 1 vs 2,3; ***2 vs 3

On the other hand, in the sclera tissue, CSP-O1 permeated the fastest, followed by CSP-O3, and again, CSP-O2 permeated the least. In this case, both CSP-O2 and CSP-O3 were fitted to a linear curve, while CSP-O1 was fitted to a single-site binding model. The permeation parameters were calculated in the linear section of CSP-O1, even though CSP-O2 and CSP-O3 are already linear, as can be seen in Table 4.

The fact that all formulations are able to permeate through tissue indicates that CSP will pass into the aqueous humor through the cornea and into the vitreous humor through the sclera.

The amount of CSP retained (Q_r) in the cornea and sclera was also calculated (Table 4). For CSP-O1, the amount retained in the cornea was 28.83 ± 2.81 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ and 48.79 ± 5.23 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ for the scleral tissue. For the CSP-O2 formulation, we found 11.47 ± 1.79 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ and 30.61 ± 3.47 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, for corneal and scleral tissue, respectively. Finally, for CSP-O3, the amounts retained for the cornea and sclera were 7.03 ± 0.75 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ and 20.09 ± 2.43 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$. In view of the results obtained and probably due to the difference in thickness between the two tissues, more CSP is retained in the sclera than in the cornea [41,42].

It should be noted that this method is static and would not resemble the real conditions of application of the formulation, so *in vivo* studies would be necessary to help objectively discard invalid formulations. To date, no previous studies have been reported where the permeation parameters of CSP through ocular tissue have been calculated. CSP-O1 would be the formulation capable of retaining significant amounts of CSP in both corneal and scleral tissue, suggesting that it is the best formulation to ensure local action.

2.6. Histological Evaluation

For histological analysis, the cornea and sclera were treated with serum as a control condition (Figure 8A, F) and with ethanol and water (50:50) as a positive control (Figure 8B, G). The ethanol dilution induced the loss of corneal epithelium and disrupted the choroid, which is the upper layer of the sclera and rich in blood vessels, melanocytes, and fibrocytes. The treatment with CSP-O1 (Figure 8C, H), CSP-O2 (Figure 8D, I), and CSP-O3 (Figure 8E, J) formulations did not induce remarkable changes in the corneal epithelium; only CSP-O3 induced the loosening of the corneal stroma, which was also present in positive control conditions. With regard to the sclera, only CSP-O3 induced the contraction of the choroid and the loosening of the sclera.

Overall, the CSP-O2 formulation was the one that showed the fewest histological changes, followed by the CSP-O1 formulation.

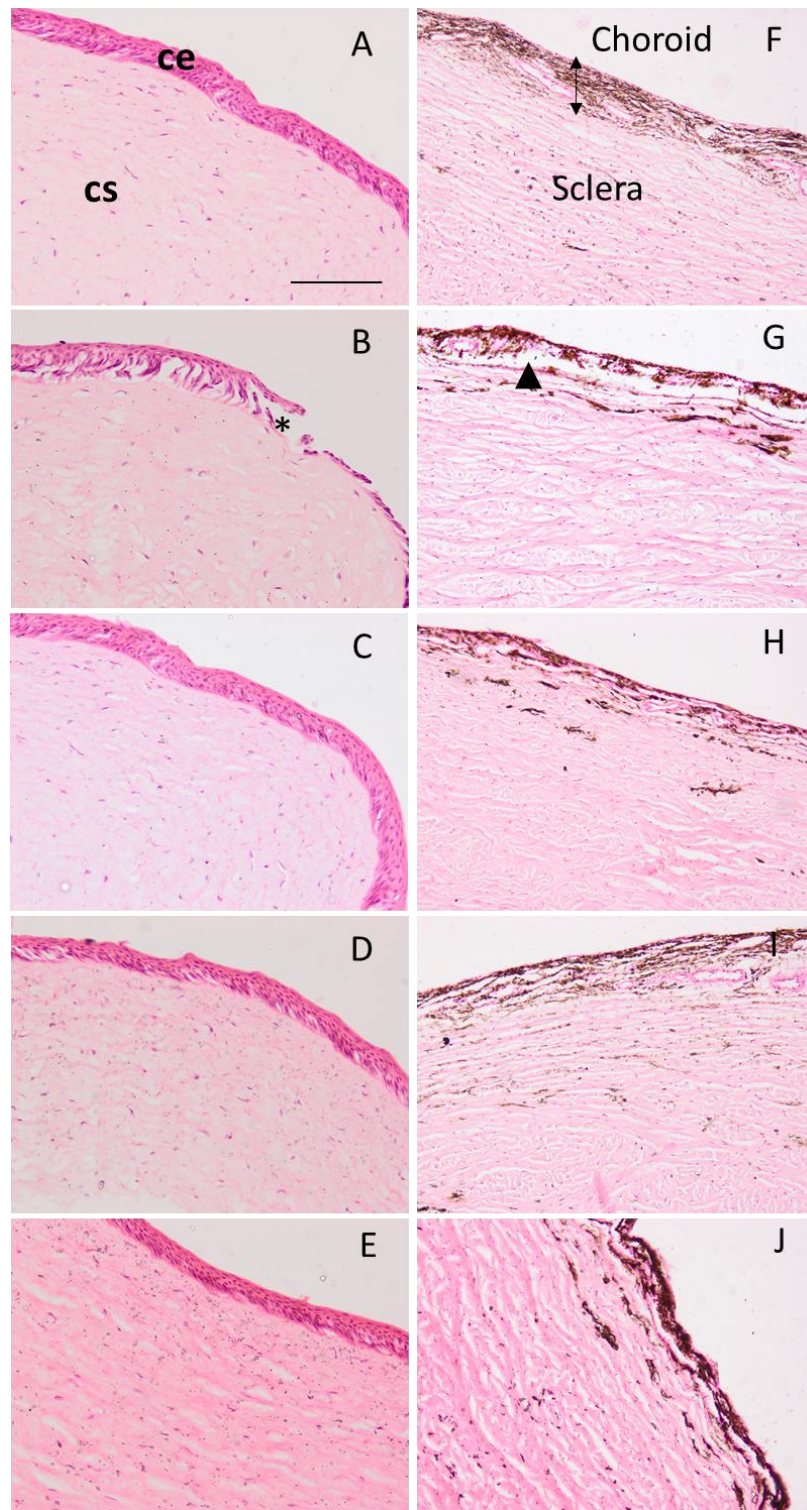


Figure 8. Cornea and sclera sections observed under the microscope. For histological assessment, sections of the cornea (A–E) and sclera (F–J) were stained with hematoxylin and eosin and photographed at 200× and 100×, respectively. After the *ex vivo* permeation assay, tissues were treated with physiological serum (A, F), ethanol-water 50:50 (B, G), CSP-O1 (C, H), CSP-O2 (D, I), and CSP-O3 (E, J). ce—corneal epithelium; cs—corneal stroma (lamina propria). Asterisk indicates a loss of the corneal epithelium, and the arrowhead indicates a disruption of the choroid. Scale bar: 200 μ m (100×) and 100 μ m (200×).

Although these results indicate that the formulations, with the exception of CSP-O3, are suitable for use and did not induce significant changes in the corneal epithelium, *in vivo* studies are still needed to confirm if similar results are obtained.

2.7. Antifungal Efficacy

Caspofungin is known to be effective against several *Candida* strains [43]. In this work, CSP was loaded into three different formulations (CSP-O1, CSP-O2, and CSP-O3), and a qualitative antifungal efficacy test was conducted to verify that the formulations maintained the antifungal effect. The study has shown that the CSP-loaded formulations are effective against most of the tested *Candida* spp., and the antifungal action of CSP was highly effective against four out of five *Candida* strains tested, with the exception of *C. auris* strain DSM 21092, where we found that the formulations strongly inhibited the yeast growth for the first 24 h of incubation but a small resistant growth appeared at 48 h (Figure 9). In general, all formulations were able to produce large areas of inhibition, evidencing the efficacy of these formulations.

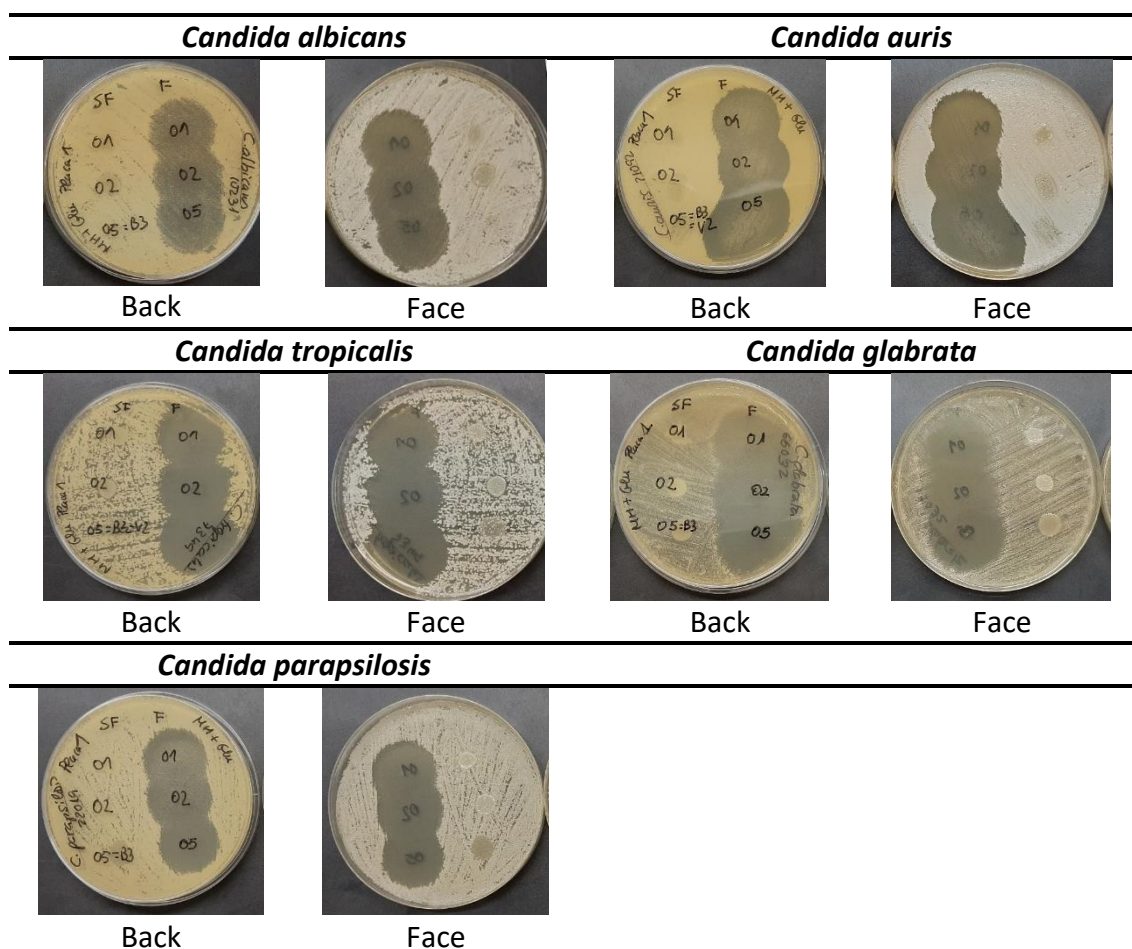


Figure 9. Inhibition zones produced by formulations with and without 0.5% caspofungin against yeast *C. albicans* ATCC 10231, *C. auris* DSM 21092, *C. tropicalis* ATCC 7349, *C. glabrata* ATCC 66032, and *C. parapsilosis* ATCC 22019. In a frontal view (face), the Caspofungin formulations marked “F” are seen on the left of the plate, and the excipients O1, O2, and O3 marked “SF” on the right, whereas in a view from the reverse (back) of the plate, positions are reversed.

As for the formulations without CSP load (O1, O2, and O3), it was observed that the high-concentration poloxamer-based formulation (O3) prevented the growth of the *Candida* strains tested on the application zone (Table 5). Our results are in line with the previous reported efficacy

of these types of formulations against fungal infections. It is known that there are synergistic effects between P407 and the antifungal agents [44]. Table 5 summarizes the results obtained.

Table 5. Antifungal activity of the CSP formulations with and without CSP.

Yeast tested	Origin	Formulations with and without CSP					
		CSP-O1	O1	CSP-O2	O2	CSP-O3	O3
<i>C. albicans</i>	ATCC 10231	++	-	++	-	++	+
<i>C. glabrata</i>	ATCC 66032	++	-	++	-	++	+
<i>C. parapsilosis</i>	ATCC 22019	++	-	++	-	++	+
<i>C. tropicalis</i>	ATCC 7349	++	-	++	-	++	+
<i>C. auris</i>	DSM 21092	R	-	R	-	R	+

2.8. In Vitro Tolerance Study

After application of formulations to the chorioallantoic membrane of 10-day-old embryonic eggs, no irritating effect was observed after 5 min. The results are shown in Figure 10. Physiological saline solution, which is known to be non-irritant, and 0.1 N sodium hydroxide (NaOH) solution, which produced hemorrhage, coagulation, and coagulation by lysis of blood vessels from the onset, were used as controls.

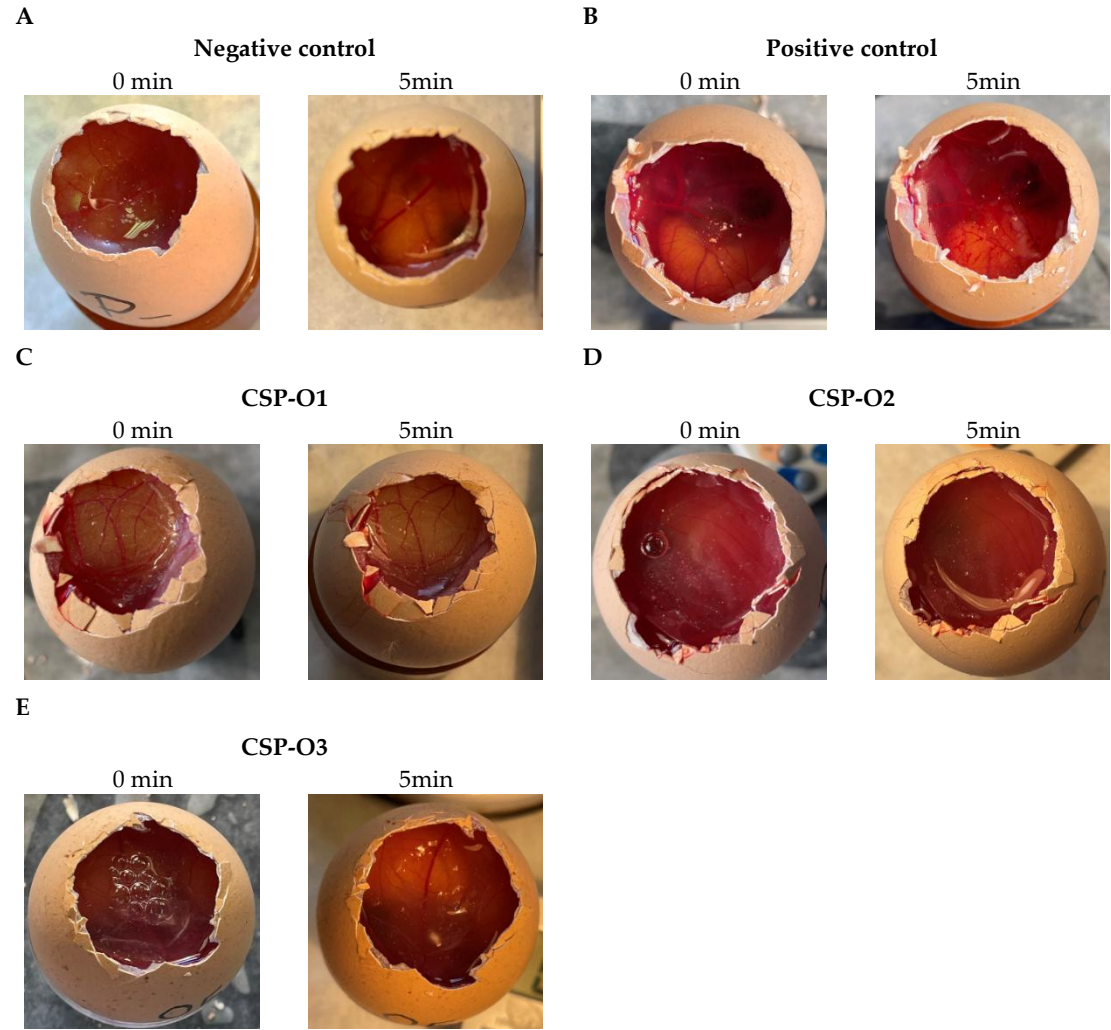


Figure 10. Results of the HET-CAM test: (A) physiological saline solution as the negative control; (B) NaOH 0.1 N as the positive control; (C) CSP-O1 formulation; (D) CSP-O2 formulation; and (E) CSP-O3 formulation.

After the HET-CAM test, the irritation score (IS) of CSP-loaded formulations was calculated. The results obtained are reported in Table 6. All formulations showed values below 0.09, therefore all are classified as non-irritating.

Table 6. Irritation Score (IS) of formulations tested with the HET-CAM test.

Formulation	IS value	Classification
CSP-O1	0.069	N.I.
CSP-O2	0.085	N.I.
CSP-O3	0.113	N.I.

N.I.—no irritating ($IS \leq 0.9$); weakly irritating ($0.9 < IS \leq 4.9$); moderately irritating ($4.9 < IS \leq 8.9$); and irritating ($8.9 < IS \leq 21$) [45].

To contrast the information obtained by HET-CAM, the transparency of the corneas was observed when the formulations were applied. The transmittance profile can be seen in Figure 11. A physiological saline solution was used as a negative control, and ethanol, which reduced corneal transparency, was used as a positive control. All formulations have the same spectrum at 485 nm and then change. A relative minimum is also observed in all of them between 600 and 605 nm. CSP-O1 does not significantly differ from the positive control, CSP-O2 is very similar to the negative control, and CSP-O3 lets more light through than the control. The transmittance profiles of CSP-O2 and CSP-O3 indicate that both formulations do not affect corneal transparency.

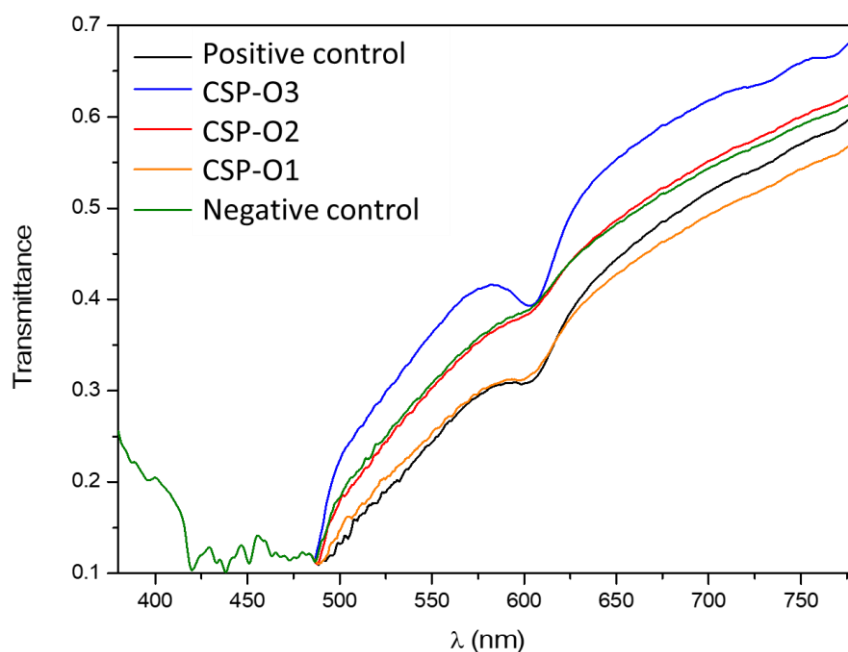


Figure 10. Transmittance profile from 400 to 800 nm wavelength of corneas treated during 10 min with ethanol as positive control, physiological saline solution as negative control, CSP-O1; CSP-O2 and CSP-O3.

The chorioallantoic membrane is very sensitive to chemicals [46,47]. The HET-CAM test is suitable to test for potential eye irritation after application of the formulations. All formulations have proven to be non-irritating and should therefore be well tolerated. However, changes in corneal transparency were observed with CSP-O1. CSP-O3 proved to be better than CSP-O2. Additional studies are still needed to evaluate formulations without the need for human testing and to exclude formulations more objectively. One of the techniques that could be used is synchrotron X-ray scattering analysis to assess the structure of collagen in the cornea, which is responsible for transparency [48,49]. It should be noted that most methods are static and would

not correspond to the real conditions of application of the formulation, so *in vivo* studies would be necessary to help objectively contrast the results obtained.

3. Conclusions

Three formulations containing CSP were designed and characterized: CSP-O1, CSP-O2, and CSP-O3. Physiological saline was used to prepare CSP-O1, while the other two were made with P407 at 0.2% and 18%, respectively. All of them with CSP at 0.5%.

Short-term stability showed that the formulations should be kept at 4°C. However, CSP-O2 and CSP-O3 showed to be also stable at 25°C. Rheological studies revealed that CSP-O3 was able to gel *in situ* while CSP-O2 was not due to the low concentration of P407 in its composition. TOWL values increased in all cases, whether on blank eyes or treated eyes, when applying the formulations to the eyeball. A remarkable increase in the first 30 min was observed with respect to the blank, probably because of the water content in the formulations. Progressive dehydration of the cornea, especially the scleral tissue, was observed over time. Formulations CSP-O1 and CSP-O2 minimized this effect.

The CSP release study followed the one-site binding model, showing that CSP-O1 is the formulation that releases the most CSP as well as the formulation that retains the most CSP in the ocular tissue. However, permeation studies showed that CSP-O3 is the formulation that permeates the most through the cornea and CSP-O1 through the scleral tissue. Histological sections indicated that CSP-O3 induced corneal stromal loss, while the others did not induce significant changes in the corneal epithelium. The antifungal activity showed that all formulations inhibited the growth of *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, and *C. tropicalis*, but *C. auris* showed to be resistant to the CSP formulations. Finally, the formulations proved to be non-irritating to the chorioallantoic membrane, and CSP-O2 and CSP-O3 did not alter corneal transparency, an important factor to take into account to ensure patient adherence to treatment. All these findings suggest that, among all the three formulations investigated, CSP-O2 appears to be the most promising for topical ocular CSP delivery.

4. Materials and Methods

4.1. Materials

4.1.1. Chemical and Reagents

CSP acetate salt was supplied by SunPharma (Barcelona, Spain). Trifluoroacetic acid and methanol were acquired from Sigma Aldrich (Madrid, Spain). Pluronic® F-127 (P407) was provided by BASF (Barcelona, Spain). Double-distilled water was obtained from a Milli-Q® Gradient A10 system apparatus (Millipore Iberica S.A.U.; Madrid, Spain). Physiological saline solution was purchased by Grifols Laboratories S.A. (Barcelona, Spain). Ketamine HCl was supplied by Pfizer (Madrid, Spain). Xylazine was acquired by Laboratories Calier (Barcelona, Spain). Midazolam, propofol, and sodium thiopental were supplied by B. Braun Medicals (Barcelona, Spain). Isoflurane was purchased from Baxter (Valencia, Spain). Polytetrafluoroethylene (PTFE) membranes were provided by Pall® Corporation (Madrid, Spain). All other chemicals and reagents used in this study were HPLC-grade, unless otherwise stated.

4.1.2. Biological Tissue for *Ex Vivo* Assays

Corneal and scleral membranes were acquired from female pigs weighing approximately 25 kg. Animals were sacrificed under veterinary supervision at the Animal Facility of the Bellvitge Campus of the University of Barcelona (Spain) and with the agreement of the Animal Experimentation Ethics Committee of the University of Barcelona, Spain (CEEa-UB) code 10617.

Pigs were anesthetized with ketamine HCl (3 mg/kg), xylazine (2.5 mg/kg), and midazolam (0.17 mg/kg). After sedation, propofol (3 mg/kg) was administered, and then the patient was intubated and maintained under inhaled anesthesia with isoflurane. Finally, with an overdose of thiopental, the animals were euthanized.

The cornea and sclera of the animals were cut away, placed in an artificial tear solution, and refrigerated until experiments. Before use, ocular tissues were superficially cleaned with gauze soaked in a 0.05% dodecyl sulfate solution, followed by distilled water.

4.2. Preparation of CSP-Loaded Formulation

In this study, three formulations of loaded CSP were designed and developed. A physiological saline solution was chosen to develop the first formulation (CSP-O1). CSP-O1 was obtained by solubilizing of 0.5% (*w/v*) CSP in physiological saline solution.

It was decided to use P407 due to its amphiphilic nature for the remaining formulations. P407 is a copolymer consisting of a hydrophobic polypropylene oxide (PPO) core block flanked by hydrophilic polyethylene (PEO) blocks to give a final PEO-PPO-PEO structure. It is this structure that gives it the ability to solubilize active ingredients through the formation of micelles. As CSP is a water-soluble drug, it would be located in the PEG block [34,50].

CSP-O2 was prepared as follows: a concentration of 0.2 % (*w/v*) P407 and 0.5 % (*w/v*) CSP was mixed and stirred at 4°C until it was homogenized.

A concentration of 18% (*w/v*) P407 was initially dissolved and stirred overnight at 4°C (O3). In order to obtain a CSP-loaded P407 hydrogel (CSP-O3), 0.5% (*w/v*) CSP was added to O3. The formation of this hydrogel is explained in previous studies of the group [24].

No insoluble particles were visually detected after sample preparation. Thus, all formulations were stored at 4°C.

4.3. Physicochemical Characterization

4.3.1. pH Measurements and Appearance

A digital pH/mV meter, pH 200 (Crison Instruments S.A., Barcelona, Spain), was used for pH evaluation. Measurements of the formulations were made at 25°C, with the formulations freshly prepared and stored at 4, 25, and 32°C for three weeks after preparation. Values were recorded as the mean $\pm$ SD of three replicates.

Samples stored at 4, 25, and 32°C were also visually inspected for physical appearance. Parameters such as color or tendency to spontaneously precipitate could be appreciated.

4.3.2. Rheological Behavior

A Haake RheoStress 1 rheometer connected to a Thermo Haake Phoenix II + Haake C25P temperature control (Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe, Germany) was employed for rheological characterization of samples. It was equipped with a parallel plate geometry configuration, including a fixed bottom plate and a movable Haake PP60Ti top plate (60 mm diameter), and operated with Haake RheoWin® Job Manager and Data Manager v. 4.87 software.

Each sample was equilibrated for approximately 5 min until it reached the operating temperature by placing it between the plate-plate sensor system, 0.5 mm apart, to determine viscosity and flow behavior. They were subjected to a three-stage shear profile test after reaching the desired temperature of 4, 25, and 32°C: an increase period (0–50 s⁻¹) for 3 min, a period of constant shear rate at 50 s⁻¹ for 1 min, and a decrease period (50–0 s⁻¹) for 3 min. All determinations were measured in triplicate. Various mathematical models were fitted to the data from the flow curves: Cross, Herschel-Bulkley, Newton, Bingham, Casson, and Ostwald-de-Waele [51]. The model that best described the experimental data obtained was determined based on the best value of the correlation coefficient (*r*).

Apparent thixotropy was determined by the presence or absence of a hysteresis loop, and viscosity averages (Pa·s) were determined at 50 s⁻¹ from the constant shear rate period of each viscosity curve. Values are reported as the mean ± SD of three replicates for each formulation and each temperature.

Moreover, the thermosensitive gelation process of the CSP-O3 formulation was researched by ranging the temperature from 10 to 40°C in oscillation mode with a fixed frequency of 1 Hz and a constant voltage of 0.5 Pa. The samples were equilibrated in the same way as for the rotational mode until the initial temperature of 4°C was reached. A controlled ramp rate was used to increase the temperature from 10 to 40°C for 2000 s, and the moduli G' and G'' as well as the complex viscosity (η^*) were recorded. The temperature at which the crossover was detected where G' = G'' was established as the gelling temperature or SOL-GEL temperature transition (TSOL-GEL) [27,52].

4.3.3. Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR)

A JASCO 6200 (JASCO Analítica Spain, Madrid, Spain) with an attenuated total reflection (ATR) diamond and SPECTRA MANAGER v2 as software were used for FTIR spectra of CSP and formulations. The scanning range was 4000–400 cm⁻¹, with a resolution of up to 0.25 cm⁻¹.

4.4. Ocular Hydration Measurements

The measure of hydration is based on the capacitance of a dielectric medium, utilizing the relatively high dielectric constant of water compared to that of other materials. The corneometer contains two electrodes with different electrical charges that create an electromagnetic field that determines the dielectricity of the stratum corneum.

A Corneometer® 825, mounted on a Multi Probe Adapter® MPA5 (Courage & Khazaka Electronics GmbH, Cologne, Germany), was employed for the measurements. There are no known studies that have determined hydration values in the corneal and scleral membranes, so this would be the first time the term ocular hydration has been described. There are no known studies that have determined hydration values in the corneal and scleral membranes, so this would be the first time the term ocular hydration (OH) has been described. OH values (arbitrary units, AU) were expressed as the mean ± SD of 10 replicates before and after application of the formulations to the cornea and sclera membranes for at least 2 h.

4.5. Transocular Water Loss Measurements

Transepidermal water loss (TEWL) is a measure of the amount of water that evaporates and diffuses out of the skin through the epithelium into the surrounding atmosphere. Is a well-established method for the assessment of the integrity of the skin barrier function. Similarly, the integrity of the biological function of the corneal and scleral membranes will be determined using TOWL as an indicator. To date, there are no known studies that have determined TOWL values, so this would be the first time they have been described.

A Tewameter® TM 300 (Courage & Khazaka Electronics GmbH, Cologne, Germany) was used for the measurements. The electrode was positioned on the surface of the tissues for 1 min without any pressure. It is important to maintain optimal room environmental conditions. Therefore, measurements were taken with a relative humidity of 60% and a temperature of 25°C. TOWL values (g/m²·h) were expressed as the mean ± SD of 10 replicates before and after application of the formulations for at least 2 h on the cornea and sclera membrane.

4.6. In Vitro Release and Kinetic Evaluation

Vertical diffusion Franz cells (FDC 400, Crown Glass, Somerville, NY, USA) made of amber glass with a receiver chamber volume of 12 mL and an effective diffusion area of 2.54 cm² were

used for the CSP release studies. The membrane used was polytetrafluoroethylene (wvPTFE, 0.45 μm ; 47 mm). To recreate *in vivo* ocular conditions, the system was maintained at $32 \pm 0.50^\circ\text{C}$ throughout the test. Physiological saline was used as the receiving fluid, and the whole system was covered with parafilm to prevent evaporation and kept under continuous agitation at 600 rpm.

During different time intervals during the next 28 h, sample aliquots were extracted and analyzed to determine the amount of CSP released. The CSP concentration is presented as the mean $\pm$ SD of five replicates. The values obtained were fitted to different kinetic models. The best-fitting model was selected based on the best r^2 value. Finally, some amodelistic parameters such as MDT, AUC, and E were also calculated.

4.7. *Ex Vivo* Permeation of CSP Through Ocular Mucosa

Vertical diffusion Franz cells (FDC 400, Crown Glass, Somerville, NY, USA) made of amber glass with a receiver chamber volume of 5 mL and an effective diffusion area of 0.64 cm^2 were used for the CSP permeation studies with porcine corneas and sclera membranes as membranes. A known amount of sample was placed in the donor compartment, while the receiver compartment was filled with physiological saline solution. The system was maintained at $32 \pm 0.50^\circ\text{C}$ for the corneal tissue and $37 \pm 0.50^\circ\text{C}$ for the scleral tissue. As in the release study, everything was isolated with parafilm to avoid possible evaporation and left in continuous agitation until the end of the study.

During 6 h at different time intervals, sample aliquots were taken and equal volumes replaced. The samples were analyzed to determine the permeated drug concentration. The amount of CSP permeated through the tissues is expressed as the mean $\pm$ SD of six replicates of each tissue for each sample.

The amount of CSP permeated through porcine corneas and sclera per unit area ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) at each time point was calculated from the concentration of CSP in the receptor fluid and plotted as a function of time (h). The flux (J , $\mu\text{g}/\text{h}$) or slope was calculated using Prism[®] software, V. 5.00 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). The permeability coefficients (K_p , cm/h) of the formulations were calculated using the following equation [53]:

$$K_p = J/C_0 \quad (2)$$

where C_0 is the initial drug concentration in the donor compartment, 5000 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Finally, the cumulative permeated amount of CSP at the end of the study (A_6) was calculated, i.e., the amount accumulated at 6 h. For corneal permeation, A_6 refers to the amount of CSP that would penetrate into the aqueous humor, while for scleral permeation it refers to the amount that would pass into the vitreous humor.

At the end of the permeation study, the tissues were removed and the amount of CSP (Q_r , $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) retained in them was calculated. After removal of the tissues, they were wiped with gauze soaked in 0.05% sodium laurel sulphate and were washed with distilled water. This was done to remove possible residues of the formulations.

The permeation areas were cut, weighed, and punctured with a fine needle. They were then placed in an ultrasonic bath and immersed in 2 mL of physiological saline solution for 15 min. The samples were analyzed, and the amount of CSP retained (Q_r , $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) is expressed as the mean $\pm$ SD of six replicates of each tissue for each sample.

4.8. Analysis of CSP in Solution

The samples produced from *in vitro* release and *ex vivo* permeation tests were analyzed by a validated UPLC method. The UPLC system consisted of an Acquity I CLASS UPLC System (Waters, Milford, CT, USA) coupled to an Acquity TUV and an Acquity Fluorescence Detector.

The excitation and emission wavelengths for fluorescence detection were 224 and 304 nm, respectively. A Lichrospher RP-8 column (125 × 4 mm, 5 µm, Phenomenex) was employed for the separation.

The method was previously validated according to the ICH Q2 (R1) guidelines. Conditions maintained the column at room temperature. The flow rate was 0.8 mL/min for 8 min, and the injection volume was 10 µL. Mobile phase A comprised 0.1% trifluoroacetic acid (TFA) in Milli-Q® water, and mobile phase B consisted of methanol. The gradient elution program was 50–50% B for 0–5 min; 100% B for 5–6 min; and 50–50% B for 6–8 min.

4.9. Histological Evaluation

The hematoxylin-eosin stain was used to assess the architecture of the cornea and the sclera treated with CSP-O1, CSP-O2, and CSP-O3 formulations after the *ex vivo* permeation assay. Following the incubation period, the tissue samples were rinsed in PBS and dehydrated in an increased gradient of ethanol before being placed in xylene and finally embedded in melted paraffin wax. Then tissue blocks were sectioned at 5 µm with a microtome (Leica RM2135), rehydrated, stained with hematoxylin and eosin, and finally mounted with DPX (Sigma). Sections were observed at 100× and 200× magnification under a light microscope (Olympus BX41), and a camera (Olympus XC50) was used for the acquisition of the images. From the six replicates obtained after the *ex vivo* permeation study, the best corneal and scleral image was selected.

4.10. Antifungal Efficacy

The loaded and unloaded formulations of caspofungin were tested to qualitatively examine whether they maintained the antifungal effect. To this end, a modified Kirby-Bauer disc diffusion test [54] was selected, and a similar methodology described in the test protocol [55,56] was followed. The disc diffusion test is based on the diffusion capacity of the antibiotics/antifungals around the area where the sample has been applied.

C. albicans ATCC 10231 (American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA), *C. glabrata* ATCC 66032, *C. parapsilosis* ATCC 22019, *C. tropicalis* ATCC 7349, and *C. auris* DSM 21092 (German collection of microorganisms and cell cultures GmbH) were used as *Candida* strains for the test. First, they were grown aerobically in Mueller-Hinton (MH) medium supplemented with glucose 2% at 30°C for 48 h. Inoculum was prepared by suspending colonies in Ringer's solution to the desired density (0.5 McFarland). The 2% MH-glucose plates were inoculated three times over the entire agar surface with the aid of a yeast-soaked swab, rotating the plate by about 60° each time to ensure even distribution of the inoculum, which could result in a confluent lawn of growth.

Both 0.5% CSP-loaded formulations (CSP-O1, CSP-O2, and CSP-O3) and non-CSP-loaded formulations (O1, O2, and O3) were studied. Nystatin 100 IU/mL and amphotericin B 250 µg/mL were used as controls. Due to the nature of the samples, discs could not be soaked with the samples, and 5 µL of each formulation were deposited on 2% MH-glucose agar inoculated with yeast, and the plates were incubated at 30°C for 48 h. Each formulation was tested in triplicate for each strain.

4.11. In Vitro Tolerance Study

4.11.1. Ocular Irritation Assay: HET-CAM

An *in vitro* ocular irritation assay was performed to determine the potential irritating properties of the developed formulations. A 10-day-old embryonated hen egg from the G.A.L.L.S.A. farm in Tarragona was used for the HET-CAM test, which measures the ability to induce irritant effects on the chorioallantoic membrane (CAM). The eggs were incubated at a temperature of 37 ± 0.5°C and a relative humidity of 50–60%. In the experimental procedure, 300

µL of the formulations were applied to CAM, and the degree of severity of each reaction was observed. NaOH 0.1 N was used as the positive control and physiological saline solution as the negative control. The INVITTOX 15 protocol was used for this assay [57]. Both formulations and controls were tested in triplicate.

During the test, the direct observation of hemorrhage (bleeding), coagulation (blood vessel disintegration), and vessel lysis coagulation (protein denaturation intra- and extravascular) was performed for 5 min. Each element was considered individually and then combined to obtain a score (IS), which was used to classify the irritancy level of the formulation and was calculated using the following equation:

$$IS = \frac{5 \cdot (301 - \text{sec } H)}{300} + \frac{7 \cdot (301 - \text{sec } V)}{300} + \frac{9 \cdot (301 - \text{sec } C)}{300} \quad (3)$$

where sec is the time in seconds when signs started, H is the hemorrhage, V is vessel lysis and C is the coagulation. The formulations were classified according to the following: $IS \leq 0.9$ no irritating; $0.9 < IS \leq 4.9$ weakly irritating; $4.9 < IS \leq 8.9$ moderately irritating; $8.9 < IS \leq 21$ irritating [43,55].

4.11.2. Cornea Transparency

To assess changes in corneal transparency after application of the formulations, corneas were exposed to a defined light beam and transmitted light was detected without absorption or transmission. The transmittance of the corneas was evaluated from 150 to 760 nm after contact with the formulations, physiological saline solution, as a negative control, and ethanol, as a positive control, for 10 min [40]. Both formulations and controls were tested in triplicate.

4.12. Statistical Analysis

Experimental results were statistically examined by one-way analysis of variance (ANOVA) using GraphPad Prism® v. 5.00 software (Graphpad Software Inc., California, USA). The significance level was set at 0.05 and differences between independent groups were determined by applying Tukey's test and adopting a 95% confidence level.

Supplementary Materials: No supplementary materials are available for this article.

Author Contributions: N.P.-G.: Investigation, methodology, writing—original draft, formal analysis; ; M.J.R.-L.: investigation, methodology; A.C.C.-C.: conceptualization, investigation, methodology, formal analysis, funding acquisition, supervision; L.H.: Investigation, methodology, formal analysis; N.B.-d.F.: investigation, methodology; M.M.: investigation, methodology, writing—review & editing, formal analysis; B.C.-N.: conceptualization, investigation, methodology, writing—original draft, formal analysis, funding acquisition, supervision, writing—review & editing. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by the Spanish National Research Council (CSIC), project no. 202080E231, and the Agreement with the University of Barcelona and the University of Granada (Official State Gazette 311, on 27th November 2020).

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: The data presented in this study are available on request from the corresponding author. The data are not publicly available due to they are part of a Doctoral Thesis and it will be available once the Thesis will be published.

Acknowledgments: The authors would like to thank to AG Sanding from animal facility (University of Barcelona) for his valuable help in animal studies, as well as MJM Lopez and E Giannone from the University of Barcelona and José Antonio Morales for their excellent technical support.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Brown, L.; Leck, A.K.; Gichangi, M.; Burton, M.J.; Denning, D.W. The Global Incidence and Diagnosis of Fungal Keratitis. *Lancet Infect. Dis.* **2021**, *21*, e49–e57. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Fan, W.; Han, H.; Chen, Y.; Zhang, X.; Gao, Y.; Li, S.; Jin, Q.; Ji, J.; Yao, K. Antimicrobial Nanomedicine for Ocular Bacterial and Fungal Infection. *Drug Deliv. Transl. Res.* **2021**, *11*, 1352–1375. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Mahmoudi, S.; Masoomi, A.; Ahmadikia, K.; Tabatabaei, S.A.; Soleimani, M.; Rezaie, S.; Ghahvechian, H.; Banafsheafshan, A. Fungal Keratitis: An Overview of Clinical and Laboratory Aspects. *Mycoses* **2018**, *61*, 916–930. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Niu, L.; Liu, X.; Ma, Z.; Yin, Y.; Sun, L.; Yang, L.; Zheng, Y. Fungal Keratitis: Pathogenesis, Diagnosis and Prevention. *Microb. Pathog.* **2020**, *138*, 103802. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Sharma, N.; Sachdev, R.; Jhanji, V.; Titiyal, J.S.; Vajpayee, R.B. Therapeutic Keratoplasty for Microbial Keratitis. *Curr. Opin. Ophthalmol.* **2010**, *21*, 293–300. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Sharma, N.; Bagga, B.; Singhal, D.; Nagpal, R.; Kate, A.; Saluja, G.; Maharana, P.K. Fungal Keratitis: A Review of Clinical Presentations, Treatment Strategies and Outcomes. *Ocul. Surf.* **2022**, *24*, 22–30. [[CrossRef](#)]
7. Cabrera-Aguas, M.; Khoo, P.; Watson, S.L. Infectious Keratitis: A Review. *Clin. Exp. Ophthalmol.* **2022**, *50*, 543–562. [[CrossRef](#)]
8. Donovan, C.; Arenas, E.; Ayyala, R.S.; Margo, C.E.; Espana, E.M. Fungal Keratitis: Mechanisms of Infection and Management Strategies. *Surv. Ophthalmol.* **2022**, *67*, 758–769. [[CrossRef](#)]
9. Neoh, C.F.; Daniell, M.; Chen, S.C.A.; Stewart, K.; Kong, D.C.M. Clinical Utility of Caspofungin Eye Drops in Fungal Keratitis. *Int. J. Antimicrob. Agents* **2014**, *44*, 96–104. [[CrossRef](#)]
10. Seyedmousavi, S.; Rafati, H.; Ilkit, M.; Tolooe, A.; Hedayati, M.T.; Verweij, P. Systemic Antifungal Agents: Current Status and Projected Future Developments. *Methods Mol. Biol.* **2017**, *1508*, 107–139. [[CrossRef](#)]
11. Denning, D.W. Echinocandin Antifungal Drugs. *Lancet* **2003**, *362*, 1142–1151. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Chen, S.C.A.; Slavin, M.A.; Sorrell, T.C. Echinocandin Antifungal Drugs in Fungal Infections: A Comparison. *Drugs* **2011**, *71*, 11–41. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Boucher, H.W.; Groll, A.H.; Chiou, C.C.; Walsh, T.J. Newer Systemic Antifungal Agents: Pharmacokinetics, Safety and Efficacy. *Drugs* **2004**, *64*, 1997–2020. [[CrossRef](#)]
14. Letscher-Bru, V.; Herbrecht, R. Caspofungin: The First Representative of a New Antifungal Class. *J. Antimicrob. Chemother.* **2003**, *51*, 513–521. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Deresinski, S.C.; Stevens, D.A. Caspofungin. *Clin. Infect. Dis.* **2003**, *36*, 1445–1457. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. McCormack, P.L.; Perry, C.M. Caspofungin: A Review of Its Use in the Treatment of Fungal Infections. *Drugs* **2005**, *65*, 2049–2068. [[CrossRef](#)]
17. Vorwerk, C.K.; Tuchen, S.; Streit, F.; Binder, L.; Hofmüller, W.; Behrens-Baumann, W. Aqueous Humor Concentrations of Topically Administered Caspofungin in Rabbits. *Ophthalmic. Res.* **2009**, *41*, 102–105. [[CrossRef](#)]
18. Lalitha, P.; Shapiro, B.L.; Srinivasan, M.; Prajna, N.V.; Acharya, N.R.; Fothergill, A.W.; Ruiz, J.; Chidambaram, J.D.; Maxey, K.J.; Hong, K.C.; et al. Antimicrobial Susceptibility of *Fusarium*, *Aspergillus*, and Other Filamentous Fungi Isolated from Keratitis. *Arch. Ophthalmol.* **2007**, *125*, 789–793. [[CrossRef](#)]
19. Goldblum, D.; Frueh, B.E.; Sarra, G.M.; Katsoulis, K.; Zimmerli, S. Topical Caspofungin for Treatment of Keratitis Caused by *Candida Albicans* in a Rabbit Model. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2005**, *49*, 1359. [[CrossRef](#)]
20. Ozturk, F.; Yavas, G.F.; Kusbeci, T.; Cetinkaya, Z.; Inan, U.U.; Ermis, S.S.; Kiraz, N. Efficacy of Topical Caspofungin in Experimental *Fusarium* Keratitis. *Cornea* **2007**, *26*, 726–728. [[CrossRef](#)]

21. Hurtado-Sarrió, M.; Duch-Samper, A.; Cisneros-Lanuza, A.; Díaz-Llopis, M.; Peman-García, J.; Vazquez-Polo, A. Successful Topical Application of Caspofungin in the Treatment of Fungal Keratitis Refractory to Voriconazole. *Arch. Ophthalmol.* **2010**, *128*, 941–942. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Tu, E.Y. Alternaria Keratitis: Clinical Presentation and Resolution with Topical Fluconazole or Intrastromal Voriconazole and Topical Caspofungin. *Cornea* **2009**, *28*, 116–119. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Neoh, C.F.; Leung, L.; Misra, A.; Vajpayee, R.B.; Davies, G.E.; Fullinfaw, R.O.; Stewart, K.; Kong, D.C.M. Penetration of Topically Administered 0.5-Percent Caspofungin Eye Drops into Human Aqueous Humor. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2011**, *55*, 1761–1763. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Pérez-González, N.; Bozal-de Febrer, N.; Calpena-Campmany, A.C.; Nardi-Ricart, A.; Rodríguez-Lagunas, M.J.; Morales-Molina, J.A.; Soriano-Ruiz, J.L.; Fernández-Campos, F.; Clares-Naveros, B. New Formulations Loading Caspofungin for Topical Therapy of Vulvo- vaginal Candidiasis. *Gels* **2021**, *7*, 259. [[CrossRef](#)]
25. Neoh, C.; Jacob, J.; Leung, L.; Li, J.; Stathopoulos, A.; Stewart, K.; Kong, D.C.M. Stability of Extemporaneously Prepared 0.5-Percent Caspofungin Eye Drops: A Potential Cost-Savings Exercise. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2012**, *56*, 3435–3437. [[CrossRef](#)]
26. Irimia, T.; Dinu-Pîrvu, C.E.; Ghica, M.V.; Lupuleasa, D.; Muntean, D.L.; Udeanu, D.I.; Popa, L. Chitosan-Based in Situ Gels for Ocular Delivery of Therapeutics: A State-of-the-Art Review. *Mar. Drugs* **2018**, *16*, 373. [[CrossRef](#)]
27. Gonzalez-Pizarro, R.; Carvajal-Vidal, P.; Halbault Bellowa, L.; Calpena, A.C.; Espina, M.; García, M.L. In-Situ Forming Gels Containing Fluorometholone-Loaded Polymeric Nanoparticles for Ocular Inflammatory Conditions. *Colloids Surf. B Biointerfaces* **2019**, *175*, 365–374. [[CrossRef](#)]
28. Kotreka, U.K.; Davis, V.L.; Adeyeye, M.C. Development of Topical Ophthalmic In Situ Gel-Forming Estradiol Delivery System Intended for the Prevention of Age-Related Cataracts. *PLoS ONE* **2017**, *12*, e0172306. [[CrossRef](#)]
29. Mallandrich, M.; Fernández-Campos, F.; Clares, B.; Halbaut, L.; Alonso, C.; Coderch, L.; Garduño-Ramírez, M.L.; Andrade, B.; del Pozo, A.; Lane, M.E.; et al. Developing Transdermal Applications of Ketorolac Tromethamine Entrapped in Stimuli Sensitive Block Copolymer Hydrogels. *Pharm. Res.* **2017**, *34*, 1728–1740. [[CrossRef](#)]
30. Antunes, F.E.; Gentile, L.; Oliviero Rossi, C.; Tavano, L.; Ranieri, G.A. Gels of Pluronic F127 and Nonionic Surfactants from Rheological Characterization to Controlled Drug Permeation. *Colloids Surf. B Biointerfaces* **2011**, *87*, 42–48. [[CrossRef](#)]
31. Domínguez-Delgado, C.L.; Fuentes-Prado, E.; Escobar-Chávez, J.J.; Vidal-Romero, G.; Rodríguez-Cruz, I.M.; Díaz-Torres, R. Chitosan and Pluronic® F-127: Pharmaceutical Applications. In *Encyclopedia Of Biomedical Polymers and Polymeric Biomaterials*, 1st ed.; Mishra, M.K., Ed.; CRC Press; Taylor & Francis: London, UK, 2016; Volume 11, pp. 1513–1535. [[CrossRef](#)]
32. Singla, P.; Singh, O.; Sharma, S.; Betlem, K.; Aswal, V.K.; Peeters, M.; Mahajan, R.K. Temperature-Dependent Solubilization of the Hydrophobic Antiepileptic Drug Lamotrigine in Different Pluronic Micelles-A Spectroscopic, Heat Transfer Method, Small-Angle Neutron Scattering, Dynamic Light Scattering, and in Vitro Release Study. *ACS Omega* **2019**, *4*, 11251–11262. [[CrossRef](#)]
33. Zhang, Y.; Song, W.; Geng, J.; Chitgupi, U.; Unsal, H.; Federizon, J.; Rzaev, J.; Sukumaran, D.K.; Alexandridis, P.; Lovell, J.F. Therapeutic Surfactant-Stripped Frozen Micelles. *Nat. Commun.* **2016**, *7*, 11649. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Brugués, A.P.; Naveros, B.C.; Calpena Campmany, A.C.; Pastor, P.H.; Saladrigas, R.F.; Lizandra, C.R. Developing Cutaneous Applications of Paromomycin Entrapped in Stimuli-Sensitive Block Copolymer Nanogel Dispersions. *Nanomedicine* **2015**, *10*, 227–240. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Soriano, J.L.; Calpena, A.C.; Rincon, M.; Perez, N.; Halbaut, L.; Rodríguez-Lagunas, M.J.; Clares, B. Melatonin Nanogel Promotes Skin Healing Response in Burn Wounds of Rats. *Nanomedicine* **2020**, *15*, 2133–2147. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Berenguer, D.; Alcover, M.M.; Sessa, M.; Halbaut, L.; Guillén, C.; Boix-montañés, A.; Fisa, R.; Calpena-campmany, A.C.; Riera, C.; Sosa, L. Topical Amphotericin B Semisolid Dosage Form for Cutaneous Leishmaniasis: Physicochemical Characterization, Ex Vivo Skin Permeation and Biological Activity. *Pharmaceutics* **2020**, *12*, 149. [[CrossRef](#)]

37. Sanz, R.; Clares, B.; Mallandrich, M.; Suñer-Carbó, J.; Montes, M.J.; Calpena, A.C. Development of a Mucoadhesive Delivery System for Control Release of Doxepin with Application in Vaginal Pain Relief Associated with Gynecological Surgery. *Int. J. Pharm.* **2018**, *535*, 393–401. [[CrossRef](#)]
38. Acosta, N.; Sánchez, E.; Calderón, L.; Cordoba-Diaz, M.; Cordoba-Diaz, D.; Dom, S.; Heras, A. Physical Stability Studies of Semi-Solid Formulations from Natural Compounds Loaded with Chitosan Microspheres. *Mar. Drugs* **2015**, *13*, 5901–5919. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Giuliano, E.; Paolino, D.; Fresta, M.; Cosco, D. Mucosal Applications of Poloxamer 407-Based Hydrogels: An Overview. *Pharmaceutics* **2018**, *10*, 159. [[CrossRef](#)]
40. Meek, K.M. The Cornea and Sclera. In *Collagen: Structure and Mechanics*; Fratzl, P., Ed.; Springer US: Boston, MA, USA, 2008; pp. 359–396. ISBN 978-0-387-73906-9.
41. Meek, K.M.; Knupp, C. Corneal Structure and Transparency. *Prog. Retin. Eye Res.* **2015**, *49*, 1–16. [[CrossRef](#)]
42. Doughty, M.J.; Jonuscheit, S. Corneal Structure, Transparency, Thickness and Optical Density (Densitometry), Especially as Relevant to Contact Lens Wear-a Review. *Cont. Lens. Anterior. Eye* **2019**, *42*, 238–245. [[CrossRef](#)]
43. Brown, S.D.; Traczewski, M.M. Caspofungin Disk Diffusion Breakpoints and Quality Control. *J. Clin. Microbiol.* **2008**, *46*, 1927–1929. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Daniel Banov Synergistic Effect of Poloxamer-Based Composition and Itraconazole on Fungus and Yeast. US Patent 9,763,934, 19 September 2017.
45. Jírová, D.; Kejlová, K.; Janoušek, S.; Bendová, H.; Malý, M.; Kolářová, H.; Dvořáková, M. Eye Irritation Hazard of Chemicals and Formulations Assessed by Methods in Vitro. *Neuro Endocrinol. Lett.* **2014**, *35*, 133–140. [[PubMed](#)]
46. Garrós, N.; Mallandrich, M.; Beirampour, N.; Mohammadi, R.; Domènech, Ò.; Rodríguez-Lagunas, M.J.; Clares, B.; Colom, H. Baricitinib Liposomes as a New Approach for the Treatment of Sjögren's Syndrome. *Pharmaceutics* **2022**, *14*, 1895. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Silva-Abreu, M.; Calpena, A.C.; Espina, M.; Silva, A.M.; Gimeno, A.; Egea, M.A.; García, M.L. Optimization, Biopharmaceutical Profile and Therapeutic Efficacy of Pioglitazone-Loaded PLGA-PEG Nanospheres as a Novel Strategy for Ocular Inflammatory Disorders. *Pharm. Res.* **2018**, *35*, 11. [[CrossRef](#)]
48. Silva-Abreu, M.; Miralles, E.; Kamma-Lorger, C.S.; Espina, M.; García, M.L.; Calpena, A.C. Stabilization by Nano Spray Dryer of Pioglitazone Polymeric Nanosystems: Development, in Vivo, Ex Vivo and Synchrotron Analysis. *Pharmaceutics* **2021**, *13*, 1751. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
49. Miralles, E.; Kamma-Lorger, C.S.; Domènech, Ò.; Sosa, L.; Casals, I.; Calpena, A.C.; Silva-Abreu, M. Assessment of Efficacy and Safety Using PPAR- γ Agonist-Loaded Nanocarriers for Inflammatory Eye Diseases. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 11184. [[CrossRef](#)]
50. Soriano-Ruiz, J.L.; Calpena-Campmany, A.C.; Silva-Abreu, M.; Halbout-Bellowa, L.; Bozal-de Febrer, N.; Rodríguez-Lagunas, M.J.; Clares-Naveros, B. Design and Evaluation of a Multifunctional Thermosensitive Poloxamer-Chitosan-Hyaluronic Acid Gel for the Treatment of Skin Burns. *Int. J. Biol. Macromol.* **2020**, *142*, 412–422. [[CrossRef](#)]
51. Schramm, G.; Electron, T. *A Practical Approach to Rheology and Rheometry*; Haake: Karlsruhe, Germany, 2004.
52. Soriano-Ruiz, J.L.; Gálvez-Martín, P.; López-Ruiz, E.; Suñer-Carbó, J.; Calpena-Campmany, A.C.; Marchal, J.A.; Clares-Naveros, B. Design and Evaluation of Mesenchymal Stem Cells Seeded Chitosan/Glycosaminoglycans Quaternary Hydrogel Scaffolds for Wound Healing Applications. *Int. J. Pharm.* **2019**, *570*, 118632. [[CrossRef](#)]
53. Moussaoui, S.E.; Fernández-Campos, F.; Alonso, C.; Limón, D.; Halbaut, L.; Garduño-Ramirez, M.L.; Calpena, A.C.; Mallandrich, M. Topical Mucoadhesive Alginate-Based Hydrogel Loading Ketorolac for Pain Management after Pharmacotherapy, Ablation, or Surgical Removal in Condyloma Acuminata. *Gels* **2021**, *7*, 8. [[CrossRef](#)]
54. Bauer, A.W.; Kirby, W.M.; Sherris, J.C.; Turck, M. Antibiotic Susceptibility Testing by a Standardized Single Disk Method. *Am. J. Clin. Pathol.* **1966**, *45*, 493–496. [[CrossRef](#)]

55. CLSI. Method for Antifungal Disk Diffusion Susceptibility Testing of Yeasts; Approved Guideline. First edition. CLSI Document MA44-A. Wayne, P.A.: Clinical and Laboratory Standards Institute. 2004, Volume 24. Available online: <https://clsi.org/standards/products/microbiology/documents/m44/> (accessed on 11 July 2021).
56. CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Test: Approved Standard - Eleventh edition. CLSI Document M02-A11; Weinstein, M.P.: Clinical and Laboratory Standards Institute. 2012, Volume 32. Available online: <https://clsi.org/standards/products/microbiology/documents/m02/> (accessed on 11 July 2021).
57. Warren, M.; Atkinson, K.; Steer, S. INVITTOX: The ERGATT/FRAME Data Bank of in Vitro Techniques in Toxicology. *Toxicol. Vitr.* **1990**, *4*, 707–710. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
58. Luepke, N.P.; Kemper, F.H. The HET-CAM Test: An Alternative to the Draize Eye Test. *Food Chem. Toxicol.* **1986**, *24*, 495–496. [[CrossRef](#)]

Artículo 2

Caspofungin formulations for buccal and sublingual mucosae anti-fungal infections: physicochemical characterization, rheological analysis, release and *ex vivo* permeability profiles

«Formulaciones de caspofungina para infecciones antifúngicas de la mucosa bucal y sublingual: caracterización fisicoquímica, análisis reológico, liberación y perfiles de permeabilidad *ex vivo*»

Noelia Pérez-González, José A Morales-Molina, Ana C Calpena-Campmany, Lyda Halbaut, María J Rodríguez-Lagunas, Nuria Bozal-de Febrer, Eliana B Souto, Mireia Mallandrich, Beatriz Clares-Naveros

Pharmaceutical Development and Technology

Volume 29, 2024 - Issue 9

<https://doi.org/10.1080/10837450.2024.2415545>

ISSN	1083-7450
eISSN	1097-9867
Editorial	Taylor & Francis
Factor de impacto	2,6
Categoría	Pharmacology & pharmacy
Posición	173/354
Cuartil	Q2

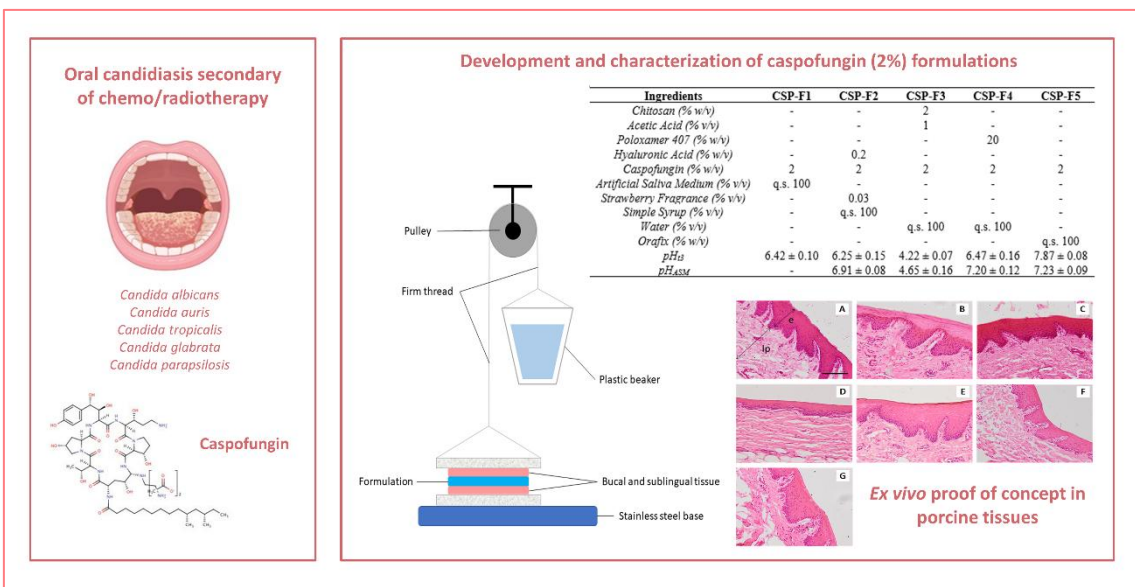
Resumen

La candidiasis oral presenta desafíos debido a la limitada efectividad de los tratamientos tópicos. Este estudio tuvo como objetivo desarrollar nuevas formulaciones de caspofungina para su administración en la mucosa oral, mejorando la retención del fármaco y su eficacia. Se desarrollaron cinco formulaciones de caspofungina (2%, p/v) para evaluar su permeabilidad, retención y mucoadhesividad. Se realizaron ensayos de permeabilidad *ex vivo* en mucosa bucal y sublingual, además de análisis histológicos para evaluar la tolerancia tisular.

La formulación basada en quitosano mostró la mayor retención en mucosa bucal ($5183.24 \pm 587.32 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) y sublingual ($1090.72 \pm 110.26 \mu\text{g}/\text{cm}^2$). Otras formulaciones presentaron retenciones significativamente menores, con valores entre 7.53 ± 0.81 y $1852.10 \pm 193.24 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ en mucosa bucal y de 1.64 ± 0.14 a $317.74 \pm 31.78 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ en mucosa sublingual. La formulación con quitosano también mostró la mayor fuerza de mucoadhesión ($5179.05 \pm 31.99 \text{ mN}/\text{cm}^2$ en bucal y $7026.10 \pm 123.41 \text{ mN}/\text{cm}^2$ en sublingual), además de una extensibilidad superior, lo que facilita su aplicación en la cavidad oral. Todas las formulaciones demostraron actividad antifúngica contra *Candida* spp., y los análisis histológicos revelaron alteraciones epiteliales leves.

Las formulaciones desarrolladas ofrecen ventajas para el tratamiento de la candidiasis oral, destacando la formulación con quitosano como la más prometedora debido a su elevada retención, fuerza de mucoadhesión y extensibilidad, lo que la convierte en una candidata potencial para futuras investigaciones clínicas.

Graphical abstract



Caspofungin formulations for buccal and sublingual mucosae anti-fungal infections: physicochemical characterization, rheological analysis, release and *ex vivo* permeability profiles

Noelia Pérez-González¹, José A Morales-Molina², Ana C Calpena-Campmany^{3,4}, Lyda Halbaut³, María J Rodríguez-Lagunas^{5,6}, Nuria Bozal-de Febrer⁷, Eliana B Souto⁸, Mireia Mallandrich^{3,4} and Beatriz Clares-Naveros^{1,4,9}

¹ Department of Pharmacy and Pharmaceutical Technology, Faculty of Pharmacy, University of Granada, Granada, Spain

² Department of Pharmacy, Torrecárdenas University Hospital, s/n Hermandad de Donantes de Sangre St., 04009 Almeria, Spain

³ Department of Pharmacy and Pharmaceutical Technology and Physical Chemistry, Faculty of Pharmacy and Food Sciences, University of Barcelona, 27-31 Joan XXIII Ave., 08028 Barcelona, Spain

⁴ Institute of Nanoscience and Nanotechnology (IN2UB), University of Barcelona, 08028 Barcelona, Spain

⁵ Department of Biochemistry and Physiology, Faculty of Pharmacy and Food Sciences, University of Barcelona, 08028 Barcelona, Spain; mjrodriguez@ub.edu

⁶ Nutrition and Food Safety Research Institute of University of Barcelona (INSA-UB), Santa Coloma de Gramenet, Spain

⁷ Department of Biology, Healthcare and the Environment, Faculty of Pharmacy and Food Sciences, University of Barcelona, Barcelona, Spain

⁸ UCD School of Chemical and Bioprocess Engineering, University College Dublin, Belfield, Ireland

⁹ Biosanitary Institute of Granada (ibs.GRANADA), 18012 Granada, Spain

* Correspondence: eliana.souto@ucd.ie and beatrizclares@ugr.es

Abstract

Aim: Oral candidiasis is often challenging due to limited effectiveness of topical treatments. This study aimed to develop novel caspofungin formulations for administration onto the oral mucosa to enhance drug retention and efficacy. **Method:** Five caspofungin (2%, w/v) formulations were developed to assess their permeability, retention and mucoadhesiveness. *Ex vivo* permeability assays were performed on buccal and sublingual mucosae, and histological analyses conducted to evaluate tissue tolerance. **Results:** Formulation composed of chitosan demonstrated the highest retention in both buccal (5183.24 ± 587.32 mg/cm²) and sublingual (1090.72 ± 110.26 mg/cm²) mucosae. Other formulations exhibited significantly lower retention, ranging from 7.53 ± 0.81 to 1852.10 ± 193.24 mg/cm² in buccal mucosa and 1.64 ± 0.14 to 317.74 ± 31.78 mg/cm² in sublingual mucosa. Chitosan-based formulation exhibited the highest mucoadhesive strength, with values of 5179.05 ± 31.99 mN/cm² for buccal and 7026.10 ± 123.41 mN/cm² for sublingual mucosae, and also superior extensibility, which facilitates application in the oral cavity. All formulations showed antifungal activity against *Candida* spp., and histological analyses revealed minor epithelial alterations. **Conclusion:** The developed formulations offer distinct advantages for treating oral candidiasis, with chitosan formulation emerging as the most promising due to its superior retention, mucoadhesion force, and spreadability, making it a potential candidate for further clinical investigation.

Keywords: Antifungal therapy; oral candidiasis; caspofungin; buccal mucosa; new drug delivery systems

1. Introduction

Patients with oropharyngeal or head cancer are usually treated with chemotherapy and radiotherapy. These increasingly effective methods can eradicate the disease completely. However, they have several short- and long-term side effects, in particular, oral mucosal disorders that compromise the integrity of the mouth and can impair the quality of life of these patients (Fiwek et al. 2023). The most commonly observed oral complications are xerostomia, taste alterations and oral candidiasis (Nishii et al. 2020).

Oral mucositis is a painful disease with erythematous lesions of the oral mucosa and affects around 80% of individuals receiving high chemotherapeutic doses (Elad et al. 2020). The pathogenesis of oral mucositis is explained by a sequence of interrelated events, namely, initiation phase, primary damage response, amplification, development of ulcers, and following the healing (Pulito et al. 2020). Reactive oxygen species (ROS) are produced during the initiation phase causing direct damage to blood vessels, cells and tissues, as well as other biological events that result in a cascade of tissue-damaging reactions. The primary damage response may induce the activation of second messengers (such as ceramide) or transcription factors, increasing pro-inflammatory cytokines. As a consequence of the primary damage response, signal amplification occurs, resulting in the acceleration of the ulceration process. At this stage, oral bacteria colonize the affected tissue, and pain appears. Finally, epithelial proliferation and differentiation leads to healing of the affected tissue by re-establishing the local oral microbiota (Sonis 2004, 2009).

Although not having an infectious aetiology, patients being treated for oral mucositis are more prone to develop local microbial infections, such as oral candidiasis (Rupe et al. 2022). This latter is the most common opportunistic fungal infection, affecting the human oral mucosa, caused by *Candida* spp. *Candida* overgrowth causes dysphagia, severe ulceration and/or local discomfort, resulting in malnutrition, therapeutic non-compliance and slow recovery (Hellstein and Marek 2019). The most abundant species are *C. albicans*, followed by *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis* and *C. krusei* (Muzyka and Epifanio 2013).

To date, no guidelines are available for the implementation of a successful treatment and/or prevention of oral mucositis. The International Society for Oral Oncology (ISOO) and the Multinational Association for Supportive Care in Cancer (MASCC) provided the treatment guidelines available, recommending the use of mouthwashes with 0.5% doxepin, 2% morphine or benzydamine, low level laser therapy or zinc-based supplements (Elad et al. 2020). Although most patients with oral candidiasis respond to topical antifungal therapy, systemic treatment is occasionally needed. However, adverse effects associated with systemic treatment usually surpass those of topically applied drug formulations. In addition, mortality rates related to invasive fungal infections remain high, and concerns about resistance to anti-infective agents have increased (Firacative 2020). Fortunately, a new family of anti-fungal agents is being developed. This new family is known as the echinocandins, which includes micafungin, anidulafungin and caspofungin (CSP) (Seyedmousavi et al. 2017).

CSP is a water-soluble (0.36mg/mL) (Drugbank 2024), semi- synthetic lipopeptide obtained from the fungus *Glarea lozoyensis*. The mechanism of action involves the blocking of the synthesis of $\beta(1,3)$ -D-glucan, which is an essential component of the cell wall of a great deal of fungal species.

Formulations for topical mucosal drug delivery should be biocompatible, mucoadhesive, stable, non-immunogenic, and capable of providing sustained release of the drug to ensure that therapeutic levels are maintained over an extended period of time yet without systemic drug exposure (Aduba et al. 2013). The treatment of oral candidiasis involves reducing the fungal load throughout the oral cavity, requiring effective drug delivery and coverage of target areas. This study aims to develop a new topical oral delivery system for CSP, given the lack of studies on its topical use in oral tissues. To achieve full coverage of the oral cavity, both liquid and semi-solid

formulations were developed. Two mouthwashes were designed: one based on artificial saliva medium (ASM) and the other on simple syrup, with ASM providing a better simulation of natural saliva. Semi-solid formulations included two hydrogels and one paste. Chitosan (CHTS) was used in one hydrogel for its antifungal and mucoadhesive properties (Debone et al. 2019; Gaspar et al. 2022; Genesi et al. 2023), while Pluronic® F-127 (P407) was used in the other for its thermo-reversible properties (de Castro et al. 2023; Galocha-León et al. 2023). The paste was based on OrafixVR, known for its mucosal adhesion and gradual release of active ingredients. Mouthwashes cover the entire mouth, while hydrogels and pastes offer easy application and enhanced therapeutic effects (Vasile et al. 2020). Combining liquid and semi-solid formulations can address various medical needs in treating oral candidiasis. Previous studies have successfully used rinses (Afrasiabifar et al. 2020; Brennan et al. 2020), ointments (Hirata et al. 2023; Naniwa et al. 2021), and hydrogels (Nagai et al. 2020; Shao et al. 2022) to reduce or prevent oral candidiasis, but no studies have used CSP in the oral mucosa due to its limited oral availability.

To achieve a diverse array of topical dosage forms with distinct drug release profiles, different types of polymers have been considered in this study. Hyaluronic acid (HA) is an anionic polymer with carboxyl (-COO-) groups; the difference in charge between the two would create electrostatic forces of attraction (López-Machado et al. 2021). CHTS is cationic in nature. Its positive charge is due to the presence of amino groups (NH₂) in its structure. When combined with a drug that is also positively charged, a complex is formed which not only improves the solubility of the drug, but also enhances its stability (Elkomy et al. 2022). P407, an amphiphilic copolymer, can improve drug solubility and modulate drug release by micellar formation (Mfoafo et al. 2022).

The aim of this study is to develop effective topical formulations for the treatment of oral candidiasis, addressing the limitations of current treatments, such as low efficacy and adverse effects. To achieve this, five CSP formulations were designed and characterized. Their physicochemical properties were evaluated, including rheological profile, mucoadhesive behavior, *in vitro* release, *ex vivo* permeability through buccal and sublingual tissues, *in vitro* antimicrobial efficacy, and histological evaluation. The specific objectives were to assess the permeability and retention of CSP in different tissues, and to determine antifungal efficacy and biocompatibility through histological analysis.

2. Materials and methods

2.1. Materials

2.1.1. Reagents and chemicals

Caspofungin (CSP) acetate salt was purchased from SunPharma (Barcelona, Spain) and poloxamer P407 from BASF (Barcelona, Spain). Uromac® (Hyaluronic Acid, <250kDa) was obtained from Nakafarma (Oviedo, Spain). Methanol, trifluoroacetic acid, medium molecular weight chitosan (CHTS, molecular weight: 190-310KDa, ≥75% deacetylated), nystatin, amphotericin B and the mucin from porcine stomach type III were obtained from Sigma Aldrich (Madrid, Spain). Potassium chloride, sodium chloride, potassium dihydrogen phosphate, sodium lauryl sulfate and acetic acid were purchased from Panreac (Barcelona, Spain). Calcium chloride dihydrate was obtained from Guinama S.L.U. (Alboraya, Spain), and propylene glycol and Orafix® from Fagron Ibérica (Barcelona, Spain). Physiological saline 0.9% (w/v) was purchased from Grifols Laboratories S.A (Barcelona, Spain). Double-distilled water was previously filtered in a Milli-QVR Gradient A10 system apparatus (Millipore Iberica S.A.U.; Madrid, Spain) before use. Simple syrup (66.5% (w/v) sucrose concentration, 1,457 refraction index, 1.316g/mL density, 100cp viscosity) and strawberry fragrance were provided by Acofarma (Madrid, Spain). Xylazine was purchased from Laboratories Calier (Barcelona, Spain). Hank's balanced salt solution (HBSS)

(Composition [g/L]: $\text{CaCl}_2 = 0.14$; $\text{KCl} = 0.14$; $\text{KH}_2\text{PO}_4 = 0.06$; $\text{MgSO}_4 = 0.1$; $\text{MgCl}_2 = 0.1$; $\text{NaCl} = 8.0$; $\text{NaHCO}_3 = 0.35$; $\text{Na}_2\text{HPO}_4 = 0.09$; Glucose = 1) was purchased from Biological Industries (Kibbutz Beit Haemek, Israel). Polytetrafluoroethylene (PTFE) membranes were obtained from PallVR Corporation (Madrid, Spain). Other reagents used in this work were of analytical grade.

2.1.1. Reagents and chemicals

Buccal and sublingual mucosa tissues were obtained from pigs (Bellvitge Animal Facilities of University of Barcelona), in agreement with the Animal Experimentation Ethics Committee of the University of Barcelona, Spain, who approved the study protocol (code 10617). Under veterinary supervision, pigs were euthanized with an overdose of thiopental. A professional veterinarian meticulously removed the mucosa from the cheeks and tongue using a scalpel immediately after sacrificing the animals. Subsequently, these samples were then placed into HBSS for a period of 2-4h to preserve their integrity and prevent any deterioration during transportation. The control mucosae underwent identical handling procedures as the samples. Once prepared, mucosae were delivered to our team for analysis in the laboratory (Amores et al. 2014; Flo et al. 2016). These tissues were superficially cleaned, first with a gauze soaked with sodium lauryl sulfate 0.05%, w/v) to remove any residue that could interfere with the assays, followed by a gauze soaked in distilled water.

2.2. Preparation of CSP formulations

The developed CSP formulations for topical administration onto the oral mucosa include two mouthwashes (CSP-F1, CSP-F2), two hydrogels (CSP-F3, CSP-F4), and one paste (CSP-F5). CSP-F1 contains 2% CSP in ASM prepared by dissolving sodium chloride (0.381g), calcium chloride dihydrate (0.213g), potassium chloride (1.114g), potassium dihydrogen phosphate (0.738g), and mucin (2.200g) in 1000ml double-distilled water, followed by pH adjustment to 7 (Ionta et al. 2014). CSP-F2 includes 2% CSP dissolved in water with HA and strawberry-flavored syrup. CSP-F3 is a CHTS- based hydrogel with 2% CSP, while CSP-F4 is a P407 hydrogel containing 2% CSP. CSP-F5 is a paste made by mixing 2% CSP with Orafix®.

After sample preparation, no insoluble particles were visually detected. We stored all formulations at 4°C. The compositions of these formulations are shown in Table 1.

Table 1. Compositions of CSP-loaded formulations (caption: q.s., quantity sufficient to).

Ingredients	CSP-F1	CSP-F2	CSP-F3	CSP-F4	CSP-F5
	Mouthwash	Mouthwash	Hydrogel	Hydrogel	Paste
Chitosan (% w/v)	-	-	2	-	-
Acetic Acid (% v/v)	-	-	1	-	-
Poloxamer 407 (% w/v)	-	-	-	20	-
Hyaluronic Acid (% w/v)	-	0.2	-	-	-
Caspofungin (% w/v)	2	2	2	2	2
Artificial Saliva Medium (% v/v)	q.s. 100	-	-	-	-
Strawberry Fragrance (% v/v)	-	0.03	-	-	-
Simple Syrup (% v/v)	-	q.s. 100	-	-	-
Water (% v/v)	-	-	q.s. 100	q.s. 100	-
Orafix (% w/v)	-	-	-	-	q.s. 100

2.3. Physicochemical characterization of CSP formulations

2.3.1. Determination of pH

The pH values of each formulation were determined with a digital pH/mV-meter-pH 200 (Crison Instruments S.A., Barcelona, Spain), by immersing the device's electrode in the samples at 25°C. The determinations were carried in freshly prepared formulations and in the formulations stored at $4 \pm 1^\circ\text{C}$ for three months. Three replicates were recorded, and values are presented as the mean $\pm$ standard deviation (SD). To simulate the conditions of their application, the formulations were firstly mixed with ASM and measured the pH again.

2.3.2. Rheological profile

The rheological analysis was performed on samples 24h post- preparation. The instrument used was a Haake RheoStress 1 rheometer with a Thermo Haake Phoenix IIpHaake C25P (Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe, Germany), which controlled the temperature of the sample. The instrument was used with a parallel plate-plate system that included a Haake PP60Ti movable upper plate (60mm diameter) and a fixed bottom plate, all operated by the Haake RheoWin® Job Manager and Data Manager software v. 4.87.

Rotational tests were run to evaluate the flow behavior and viscosity of the developed formulations. For this study, each sample was placed in between the plate-plate sensor (set up at 0.5mm gap) for 5min to allow the sample to equilibrate at the experimental temperature (4°C, 25°C, and 37°C). Then, a program of three steps shear profile was implemented: a ramp-up for 3 min (0 to 50 s^{-1}), following a constant shear rate at 50 s^{-1} for 1min, and a ramp-down for 3 min (50 to 0 s^{-1}). The shear stress (τ) versus shear rate ($\dot{\gamma}$) describes the flow curves, and the flow properties of the formulations were characterized by fitting the data from the flow curves to distinct mathematical models, namely, Cross (1), Herschel-Bulkley (2), Newton (3), Bingham (4), Casson (5), and Ostwald-de-Waele (6) (El Moussaoui et al. 2021), as shown below:

$$\tau = \dot{\gamma} \cdot (\eta_\infty + (\eta_0 - \eta_\infty)/(1 + (\dot{\gamma}/\dot{\gamma}_0)^n)) \quad (1)$$

$$\tau = \tau_0 + K \cdot \dot{\gamma}^n \quad (2)$$

$$\tau = \eta \cdot \dot{\gamma} \quad (3)$$

$$\tau = \tau_0 + \eta \cdot \dot{\gamma} \quad (4)$$

$$\sqrt{\tau} = \sqrt{\tau_0} + \sqrt{\eta \cdot \dot{\gamma}} \quad (5)$$

$$\tau = K \cdot \dot{\gamma}^n \quad (6)$$

where τ is the shear stress, η is the viscosity, $\dot{\gamma}$ is the shear rate, τ_0 is the yield value, η_0 is the zero-shear viscosity, η_∞ is the infinite shear viscosity, n is the constant index, and K is the consistency coefficient. We selected the model that best described the experimental data on the basis of the coefficient of correlation (r). The presence of a hysteresis loop determined the apparent thixotropy, which was calculated as the loop area expressed in Pa/s. We determined viscosity at 50 s^{-1} from the constant shear rate period of each viscosity curve [viscosity (η) *versus* shear rate ($\dot{\gamma}$)]. Values are reported as the mean (Pa·s) $\pm$ SD of three replicates for each formulation and each temperature.

2.3.3. Extensibility test

The extensibility test was applied to those formulations not intended for mouthwash application, i.e. it was run only for CSP- F3, CSP-F4 and CSP-F5. Briefly, we conducted the test at room temperature, placing 0.3 g of sample between two glass plates, one of them pre-marked, and avoiding the sliding of the plates. The sample was forced to spread by adding known weights

(10, 20, 50, 100, 200, and 500 g) onto the upper plate, which compressed the sample to a uniform thickness and registered the area of spreading after 60 s. The extensibility was expressed as the capacity of the formulation to spread (area) as a function of the applied mass according to equation 7 (Bakhrushina et al. 2022):

$$S = d^2 \cdot \pi / 4 \quad (7)$$

in which S is the area covered by the formulation when it is spread (cm^2) as a result of applying mass (g), and it is calculated from the diameter that reaches the samples after applying the weights (d , mean diameter (cm)). Measurements were performed three times for each sample and values are presented as the mean (cm^2) $\pm$ SD. We fitted the extensibility results to mathematical equations considering the hyperbola (one site and two sites) and Boltzmann. The r value was used to evaluate the fitting.

2.4. Mucoadhesive properties

2.4.1. Viscosity assessment

The mucoadhesive profile of CSP formulations was characterized by analysing their viscosity (Jalil et al. 2019). A solution of 1% (w/v) porcine mucin in double-distilled water was prepared and its viscosity measured before and after incubation with an equivalent amount of formulation. Mucin-formulation mixtures were allowed to equilibrate overnight at room temperature. The apparent viscosity (g) was determined in a rheometer Haake RheoStress 1 rheometer, as described in section 2.3.2. We placed each sample between the (0.5 mm gap), where it was equilibrated for 5 min at 25°C. Then, a program of three steps shear profile was implemented: a ramp-up period (0 to 50 s^{-1}) for 3min, a constant shear rate for 1min at 50 s^{-1} , and a ramp-down step for 3 min from 50 to 0 s^{-1} . The viscosity mean values ($\text{Pa}\cdot\text{s}$) $\pm$ SD were determined at 50 s^{-1} from the curves obtained after three replicate measures of the constant shear rate period.

2.4.2. Zeta potential

The mucoadhesive properties of CSP formulations was also assessed by measuring mucin's influence on the values of zeta potential (Abdellatif et al. 2020). Each sample was incubated under stirring (in a 1:1 ratio) with an equivalent amount of 1% (w/v) solution of porcine mucin. The mixtures of sample-mucin were allowed to stand at room temperature overnight. The surface charge was measured with a Zetasizer® 2000 (Malvern Instruments Ltd., Worcestershire, UK). We recorded the readings of nine replicates and expressed the results as the mean (mV) $\pm$ SD.

2.4.3. *Ex vivo* mucoadhesive test

The *ex vivo* mucoadhesive profiles of CSP-F3, CSP-F4, and CSP-F5 were studied by measuring the resistance or tension offered by the sample when trying to break the bond between the buccal and sublingual epithelial membrane and the formulation. Based on other devices (Li et al. 2012; Mei et al. 2017; Yang et al. 2017), a simple experimental set up was designed and built (Figure 1) to test the mucoadhesive force of the different formulations.

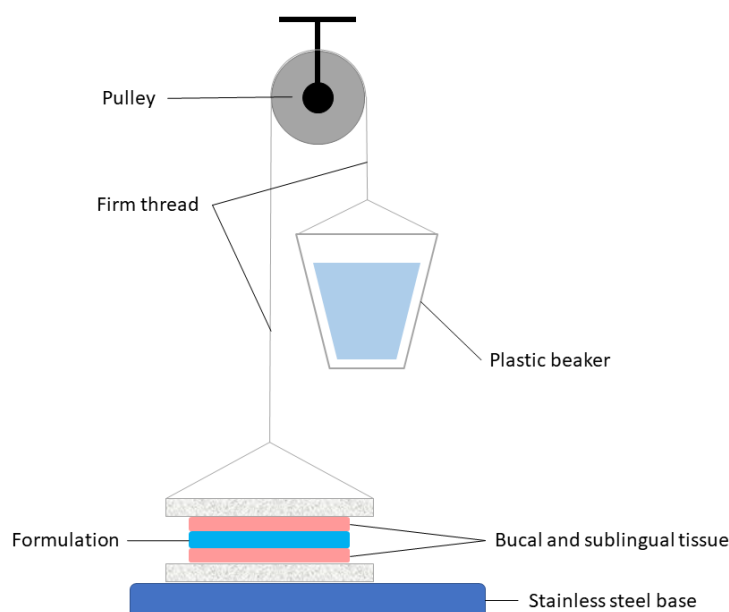


Figure 1. Schematic drawing of the device set up for the *ex vivo* mucoadhesion test.

To simulate the real conditions that samples might face after their application in the buccal cavity, porcine buccal and sublingual mucosa were cut into 2.5 x 2.5cm pieces and fixed on two planks. One was fixed on a stainless-steel base and the other was connected, through a firm thread passing over a pulley and fastened to a fixed little crown block, to a light plastic beaker. Each formulation under test (0.3 g) was placed between two pieces of substrate and then slightly pressed the upper plank. Subsequently, the beaker was filled with water at a speed of 1.0 ml/min until the two planks were pulled apart due to the force exerted by the weight of the water on the beaker. The beaker was then weighed and the mucoadhesive force (F , mN/cm²) determined according to equation (8):

$$F = (W \cdot g) / A \quad (8)$$

where W is the mass of water in kg, g is the acceleration due to gravity (980,6650cm/s²) and A is the surface area of the applied formulation in cm². The mucoadhesive force (F , mN/cm²) was reported for each sample as the mean value (mN/cm²) $\pm$ SD of three replicates.

2.5. Transmucosal water loss measurements

The amount of water diffusing through the porcine buccal mucosa and porcine sublingual epithelium to the surrounding atmosphere was determined by evaluating the transmucosal and sublingual water loss (TMWL) with a Tewameter® TM 300 (Courage & Khazaka Electronics GmbH, Cologne, Germany). To this end, a small hollow cylinder (electrode) was kept on the surface of the different tissues for 1 min. Two consecutive determinations were made on each tissue for each time point, including tissues of 5 animals, resulting in a total of 10 TMWL measurements for both tissues. The TMWL values (g/m²·h) were reported as the mean $\pm$ SD of ten replicates before and after applying the formulations, for at least 2 h, on buccal and sublingual mucosa.

2.6. Mucosal hydration measurements

Porcine buccal and sublingual mucosa humidity was measured with a Corneometer® 825 mounted on a Multi Probe Adapter® MPA5 (Courage & Khazaka Electronics GmbH, Cologne, Germany). The capacitance method was followed by comparing water's relatively high dielectric

constant to those of other tissue substances. The mucosal hydration (MH) values (arbitrary units, AU) were expressed as the mean $\pm$ SD of ten replicates before and after applying the formulations, for at least 2 h, on buccal and sublingual mucosa.

2.7. *In vitro* release profile

To study the release of CSP from the formulations, vertical Franz diffusion cells (FDC 400, Crown Glass, Somerville, NY, USA) were used with an amber receiver chamber volume of 12 ml and 2.54 cm² diffusional area. Polytetrafluoroethylen (PTFE) membranes (pore size: 0.45 μ m; diameter: 47 mm) connected the donor and receptor compartments. The latter was filled with 0.9% (w/v) physiological saline solution under continuous stirring at 600 rpm. To simulate buccal conditions *in vivo*, the system was maintained at 37 $\pm$ 0.5°C.

Drug release studies were conducted by applying a weighed amount of sample to the membrane, which was previously equilibrated for, at least, 30 min. Drug release studies were conducted in triplicate for each formulation. All formulations contained 2% (w/v) of CSP (see Table 1). The air bubbles below the membranes were removed during the equilibration time, previous to the application of the formulations to the membrane. Once applied, the donor compartment sealed and sampling ports with parafilm to prevent receptor fluid evaporation. At different time intervals for a maximum of 28 h, samples were collected from the receptor fluid by automated pipette and immediately replacing them with the same volume of tempered physiological saline solution. Dilution corrections were done according to the USP42- NF37-8311. The collected samples were examined for CSP content by an Ultra Performance Liquid Chromatography (UPLC) method previously validated following the ICH Q2 (R1) guidelines (see section 2.9). The release kinetics was determined by fitting the data to different kinetic models using the software GraphPad Prism V5.00 software (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). We selected the best fitting model based on the best R² value from first-order kinetic model and hyperbole model.

Additionally, non-modelled parameters, such as the area under the curve (AUC), were calculated using the software GraphPad Prism V5.00 software; the efficiency of the release (E%) was calculated starting from the AUC according to the equation 9 (Espinoza et al. 2019):

$$E_{\%} = \frac{AUC}{A_t \times T} \times 100 \quad (9)$$

where AUC is the area under the curve calculated using the GraphPad Prism, A_t is the cumulative amount of CSP released at the last sampling time point, and T is the last experimental time point. The mean release time (MRT) of the CSP was then calculated using equation 10 (Espinoza et al. 2020):

$$MRT = \frac{\sum(t_i \times \Delta A_t)}{A_{\infty}} \quad (10)$$

where *t_i* is midpoint between two sampling time points, ΔA_t is the change in the amount of CSP released at the corresponding *t_i* sampling interval, and A_{∞} is the maximum cumulative amount of drug released.

Prior to the release assay, to confirm the non-interaction of CSP with the PTFE membrane, the membrane was immersed in a physiologic saline solution containing CSP (2%, w/v) at 37°C for the same timeframe as the *in vitro* release test. The amount of CSP recovered from the medium was calculated, as follows:

$$\% \text{CSP}_{\text{recovered}} = \frac{\text{CSP (g) in solution after the assay}}{\text{CSP (g) in solution before the assay}} \times 100 \quad (11)$$

i.e. CSP in solution was quantified before immersing the membrane in the medium and at the end of the assayed and quantified, as described in section 2.9.

2.8. *Ex vivo* permeability of CSP through buccal and sublingual mucosa

Amber Franz cells (receiving chamber volume of 5 ml and 0.64 cm² diffusional area) were used to study CSP *ex vivo* permeability in porcine buccal and sublingual mucosae tissues. For this purpose, an electrical dermatome 25 mm (Nouvag AG, Goldach, Switzerland) was used to cut buccal mucosa tissues in 500 ± 50 µm pieces and sublingual mucosa tissues in 300 ± 50 µm pieces. The tissues were positioned so that the connective region was in contact with the receptor fluid and the epithelium facing the donor compartment.

Similar to the *in vitro* drug release assay, a 0.9% (w/v) physiological saline solution maintained at 37 ± 0.50°C was used as receptor medium, which was continuously stirred at 600rpm to ensure sink conditions throughout the study. The mucosae integrity was evaluated by measuring the TMWL after a period of stabilization of 30 min, before applying the formulation to the mucosa. The permeability study was conducted under infinite dose conditions, 300 mg of formulation were applied onto the membrane. Tissues were exposed to CSP-F1 and CSP-F2 for 15 min. For the CSP-F3, CSP-F4 and CSP-F5, the tissues were exposed to the formulations for 6h and, within this timeframe, samples were collected hourly from the receptor compartment (the sampling time points were: 1, 2, 3, 4, 5 and 6 h), and immediately replacing the same volume of the sample with physiological saline solution. The drug content was determined by UPLC (see section 2.9). Five replicates for buccal mucosa and five replicates for sublingual mucosa were included for each formulation, using mucosa from the same donor to minimize the interindividual variability. Results are expressed as the mean ± SD of the 5 replicates.

2.8.1. Determination of the permeability parameters

The cumulative amount of CSP (µg) permeated (Q_t) through the porcine buccal and sublingual mucosa was plotted per unit surface area (cm²) against the time (h). The permeability parameter, i.e. flux (J, µg /h), as the slope of the linear regression by GraphPad Prism®, V. 5.00 software (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA) was determined. The lag time was estimated as the X-intercept of the linear regression line and the permeability coefficients of the different formulations (K_p, cm/h) were determined according to the following equation:

$$K_p = J / C_0 \quad (12)$$

where C₀ is the drug concentration in the donor (upper) compartment at the beginning of the experiment (20000 µg/mL). Equation 13 led to predict the concentration of CSP at the steady-state (C_{ss}, µg /mL) that could be reached in plasma after a topical application of the formulations under an infinite dose approach:

$$C_{ss} = J \times A / C_{lp} \quad (13)$$

where C_{ss} is the concentration of CSP in plasma at the steady- state, J is the flux calculated by linear regression, A the hypothetical area of application (18 cm² for the buccal mucosa and 9 cm² for the sublingual mucosa), and C_{lp} is the plasma clearance (0.55 L/h) (Borsuk-De Moor et al. 2020).

2.8.2. Amount of CSP retained in the buccal and sublingual mucosa

To assess the amount of CSP remaining in the porcine buccal mucosa and sublingual mucosa (Q_r , $\mu\text{g}/\text{cm}^2$), the residual formulation was removed from the tissues with a swab once the permeability tests had finished. Then, the buccal mucosa and sublingual mucosa were collected from the Franz cells, cleaned with sodium lauryl sulphate 0.05% by gentle wiping the mucosa surface with a gauze, followed by a rinse with distilled water. The permeability areas of the buccal and sublingual mucosa membranes were cut, weighed, perforated with a thin needle, and submerged in 2 ml of 0.9% (w/v) physiological saline solution. The drug was extracted from the tissues by sonication for 15 min in an ultrasonic bath, as previously described (Mohammadi-Meyabadi et al. 2022). A sample of the solutions was collected and analyzed by UPLC (see section 2.9). Values are reported as the mean (mg/cm^2) $\pm$ SD of five replicates for each formulation and tissue.

2.9. Analysis of CSP samples

The CSP samples were analyzed by UPLC (Acquity I CLASS UPLC System, Waters, Milford, USA), following a method previously validated by us according to the ICH Q2 (R1) guidelines. The wavelength for fluorescence detection was 224 nm for excitation and 304 nm for emission (Acquity TUV and an Acquity Fluorescence Detector). Chromatography separation was performed with a Lichrospher RP-8 column (125 x 4mm, 5mm, Phenomenex), keeping the column at room temperature. The injection volume was 10mL and the flow rate was 0.8ml/min kept for 8 min. The 0.1% (w/v) trifluoroacetic acid (TFA) was assigned as the mobile phase A, and methanol as the mobile phase B. The gradient elution was set as 50% B for 0-5 min, 100% B for 5-6 min, and 50% B for 6- 8 min.

The UPLC method used has been successfully validated and all relevant validation data have been included as supplementary material.

2.10. Histological assay

After the *ex vivo* permeability assay (see section 2.8), membranes ($n = 5$ for each formulation and tissue) were rinsed with phosphate buffer saline (PBS) and treated overnight with 4% (w/v) buffered paraformaldehyde. Then, the samples were rinsed again three times with PBS and dehydrated them in graded ethanol (70%, 90%, and 100%). After incubating them in xylene, the samples were embedded in paraffin, cut into 5 μm sections, stained with hematoxylin and eosin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), and photographed under a light microscope Olympus BX41 equipped with an Olympus XC50 camera (Olympus Co., Tokyo, Japan). Tissues without formulations (blank buccal and sublingual mucosa) were used as negative control and those with ethanol (damaged buccal and sublingual mucosa) as the positive control.

2.11. Antifungal activity

The antifungal activity of the pharmaceutical formulations were tested by a modified Kirby-Bauer disk diffusion test (Bauer et al. 1966). Briefly, the methodology described in the Test Protocol (Sheehan et al. 2004; CLSI 2012) was followed with modification, namely instead of using the disk, the diffusion capacity of the antifungal was monitored on the agar from the point where the formulation was deposited. Five strains of *Candida* were used to evaluate the antimicrobial activity, namely, *Candida albicans* ATCC 10231 (American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA), *Candida auris* DSM 21092 (German collection of Microorganisms and cell cultures GmbH), *Candida glabrata* ATCC 66032, *Candida tropicalis* ATCC 7349, and *Candida parapsilosis* ATCC 22019. The strains were grown aerobically in Mueller-Hinton medium supplemented with 2% (w/v) glucose at 30°C for 48 h. Yeasts inoculums were firstly prepared by suspending colonies in Ringer's solution to obtain an equivalent density of 0.5 McFarland. The 2% (w/v) Mueller-

Hinton-glucose plates were inoculated thrice over the entire agar surface; for this, the plates were streaked with a yeast- soaked swab and rotated approximately 60° between each inoculation to ensure an even distribution of the inoculum. Caspofungin-loaded formulations (CSP-F1, CSP-F2, CSP-F3, CSP-F4, CSP-F5) were analyzed using nystatin 100 UI/mL and amphotericin B at 250 µg/mL as controls. A volume of 5 µL of these products was placed onto the yeast-inoculated 2% (w/v) Mueller-Hinton- glucose agar and incubated at 30°C for 48 h. The inhibition zone diameter was determined by ImageJ software version 1.53e. The diameter was measured in two directions for each halo, taking into account that 3 plates for each formulation and strain were inoculated, 6 readings per formulation and strain were obtained. Results are presented as the mean of the 6 measurements ± SD per each formulation. A statistical analysis was conducted to compare the efficacy of the formulations on each tested strain, by an ANOVA test followed by a Tukey post-test; the significance level was set at $p < 0.05$.

2.12. Statistical analysis

Experimental data were analysed by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's test to estimate the statistical differences between independent groups. The statistical significance level was set at $p < 0.05$ with a confidence level of 95%. The statistical software used was GraphPad Prism® software v.5.00.

3. Results

3.1. Physicochemical characterization of CSP formulations

The pH values of the fresh formulations are shown in Table 2, in comparison to the formulations stored at $4 \pm 1^\circ\text{C}$ for 3 months and when mixed with ASM.

Table 2: Recorded pH values of caspofungin formulations registered on the day of production, after stored at $4 \pm 1^\circ\text{C}$ for 3 months, and when mixed with ASM.

	CSP-F1	CSP-F2	CSP-F3	CSP-F4	CSP-F5
Freshly prepared	6.42 ± 0.10	6.25 ± 0.15	4.22 ± 0.07	6.47 ± 0.16	7.87 ± 0.08
$4 \pm 1^\circ\text{C}$ (3 months)	6.39 ± 0.08	6.22 ± 0.16	4.21 ± 0.17	6.42 ± 0.07	7.89 ± 0.13
Mixed with ASM	-	6.91 ± 0.08	4.22 ± 0.13	7.20 ± 0.12	7.23 ± 0.09

The pH values of formulations mixed with ASM were 6.91 ± 0.08 , 4.22 ± 0.13 , 7.20 ± 0.12 and 7.23 ± 0.09 for CSP-F2, CSP- F3, CSP-F4 and CSP-F5, respectively. Taking into account that the pH of ASM is 7.13, the only formulation that remained unchanged was CSP-F3, the one containing CHTS in its composition, with an initial value of 4.22 ± 0.07 . CSP is generally stable within a pH range of approximately 4 to 8; yet, its optimal stability may vary depending on the specific formulation of the product and storage conditions. Nevertheless, the pH of the formulation containing CHTS is enough for the amino group to protonate, acquire a positive charge, and reform the salt, which remains unchanged, because the acetic acid used in the hydrogel preparation does not affect the drug.

For the rheological testing, sample readings were recorded at 4°C to simulate the behavior upon storage in the refrigerator, and at 25°C to simulate the behavior after storage at room temperature. To simulate oral cavity conditions, the samples were measured at 37°C . The shear rate, ranging from zero to 50s^{-1} , was used to assess whether or not the products exhibit non-Newtonian behavior taking into account that a shear rate about 50s^{-1} simulates the topical application and swallowing. Under rotational testing, the five formulations presented different rheological characteristics (Table 3).

Table 3. Rotational rheological testing of the different CSP formulations. Each value represents the mean $\pm$ SD (n=3).

Formulation	Temperature (°C)	Best fitting model		Viscosity at 50 s ⁻¹ (mPa·s)	Apparent Thixotropy (Hysteresis area)
		Stretch Ramp-Up	Stretch Ramp-Down		
CSP-F1	4	-----	Newton, r = 0.9548	1.35 $\pm$ 0.17	Absence
	25	-----	Newton, r = 0.9415	1.01 $\pm$ 0.12	Absence
	37	-----	Newton, r = 0.9550	0.85 $\pm$ 0.06	Absence
CSP-F2	4	Newton, r = 0.9950	Newton, r = 0.9952	2.16 $\pm$ 0.03	Absence
	25	Newton, r = 0.9913	Newton, r = 0.9875	1.60 $\pm$ 0.03	Absence
	37	Newton, r = 0.9914	Newton, r = 0.9903	1.63 $\pm$ 0.05	Absence
CSP-F3	4	Cross, r = 0.9999	Cross, r = 1	2219 $\pm$ 11.83	Presence (~ 649 Pa/s)
	25	Cross, r = 0.9999	Cross, r = 1	1639 $\pm$ 11.40	Presence (~ 456 Pa/s)
	37	Cross, r = 0.9998	Cross, r = 1	1293 $\pm$ 6.88	Presence (~ 286 Pa/s)
CSP-F4	4	Cross, r = 0.9998	Newton r = 0.9999	16.76 $\pm$ 0.59	Absence
	25	-----	-----	74.41 $\pm$ 6.21	Presence
	37	-----	-----	71.02 $\pm$ 1.99	Presence
CSP-F5	4	Cross, r = 0.9998	Cross, r = 0.9999	5745 $\pm$ 11.42	Presence (~ 1352 Pa/s)
	25	Cross, r = 0.9977	Cross, r = 0.9998	3048 $\pm$ 12.64	Presence (~ 997 Pa/s)
	37	Cross, r = 0.9985	Cross, r = 0.9999	3083 $\pm$ 10.97	Presence (~ 902 Pa/s)

CSP-F1 based on ASM exhibited a very low viscosity. Figure 2A shows the plot of the viscosity curve for formulation CSP-F1, which appeared quite irregular. However, according to the result of the regression analysis, the model that best suited to experimental data was Newton's (Table 3). This finding suggests that the viscosity remained approximatively constant with the increase of the shear rate. On the other hand, the viscosity of CSP-F1 tended to decrease with increasing of temperatures from 1.35 $\pm$ 0.17 mPa·s at 4°C to 0.85 $\pm$ 0.06 mPa·s at 37°C. At the physiological temperature, the CSP-F1 presented a slightly lower viscosity than human saliva, which varies from 1.50 to 15.51 mPa depending on the experimental conditions, since this physiological fluid is a shear-thinning fluid (Preetha and Banerjee 2005).

Similar to CSP-F1, CSP-F2 based on simple syrup added with 0.2%wt HA also presented a very low viscosity and a Newtonian behavior (Figure 2B). As for CSP-F1, an increase in temperature caused a slightly decrease of viscosity from 2.16 $\pm$ 0.03 at 4°C to 1.63 $\pm$ 0.05mPa·s at 37°C.

CSP-F3 hydrogel based on CHTS exhibited a shear thinning and thixotropic rheological behavior, in accordance with the literature (Abu-Jdayil et al. 2021). The experimental data were fitted to the Cross model, confirming the shear-thinning characteristic of the product. Compared to CSP-F2 formulation, CSP-F3 hydrogel had a higher viscosity, as well as a clearer thixotropic property. The fluidizing effects of increasing temperature were also observed (Table 3, Figure 2C, D). In this case, the viscosity at 50 s⁻¹ decreased from 2237 $\pm$ 13.40 mPa·s to 1645 $\pm$ 11.87mPa·s and 1291 $\pm$ 7.08 mPa·s at 4, 25 and 37°C, respectively. In parallel, the hysteresis area reduced progressively as follows: ~649Pa/s, ~456Pa/s and ~286Pa/s (Table 3and Figure 2C, D).

The CSP-F4 formulation corresponds to a typical poloxamer- based thermo-reversible hydrogel. Table 3and Figure 2Eshow that the CSP-F4 formulation was a quasi-Newtonian fluid at 4°C. The formation of a significantly consistent gel at 25°C and 37°C made it difficult to generate adequate flow in the space between the plate-plate sensor system causing an irregularity in the arrangement. However, as expected they indicated the higher viscosity of the GEL structure at these temperatures compared with the SOL structure of the system at 4°C (16.45 $\pm$ 0.60 mPa·s).

Both the profiles and the calculated viscosities, at 25°C and 37°C, suggest that the SOL-GEL transition was $\leq 25^\circ\text{C}$.

CSP-F5 corresponds to a semisolid fatty mucoadhesive formulation with the highest consistency amongst the five formulations under study, due to the Orafix® vehicle. The flow curves and viscosity curves shown, respectively, in Figure 2F, G, revealed the shear thinning and thixotropic nature of Orafix® platform for drug loading, previously mentioned in the literature (Sanz et al. 2018; Márquez Valls et al. 2021). The better fitting to experimental data from the CSP-F2 flow curve was achieved with Cross model, that confirmed the non-Newtonian and shear thinning behavior. On the other hand, Figure 2F, G, and Table 3, show the effects of the temperature on the rheological characteristics of CSP-F5. Due to the fatty composition of the Orafix®, CSP-F5 was notably more consistent at 4°C ($5745 \pm 11.42 \text{ mPa}\cdot\text{s}$ at 50 s^{-1}) than at 25°C or 37°C where the viscosity was similar ($3048 \pm 12.64 \text{ mPa}\cdot\text{s}$ and $3083 \pm 10.97 \text{ mPa}\cdot\text{s}$ at 50 s^{-1} , respectively). The thixotropic property was also higher at 4°C (hysteresis area of $\sim 1352 \text{ Pa}\cdot\text{s}$), while it was quite similar at 25°C and 37°C ($\sim 997 \text{ Pa}\cdot\text{s}$ and $\sim 902 \text{ Pa}\cdot\text{s}$).

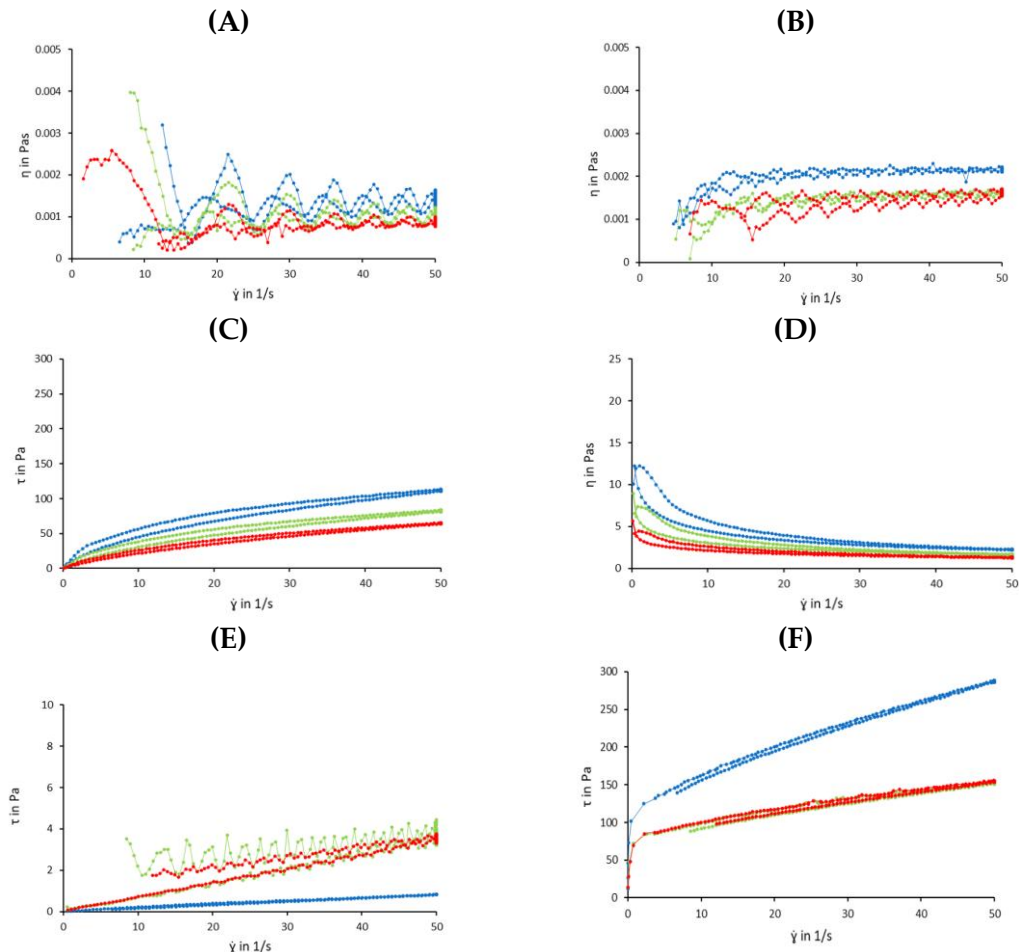


Figure 2. Cont.

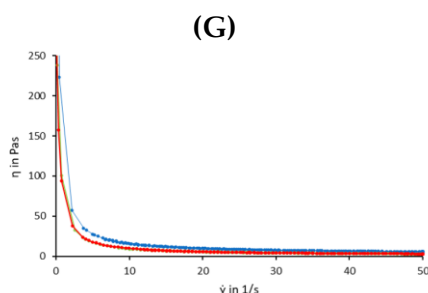


Figure 2. Effect of the shear rate and temperature at 4°C (blue line), 25°C (green line) and 37°C (red line) on the viscosity curve of CSP-F1 (A) and CSP-2 (B); on the flow curve (C) and viscosity curve (D) of CSP-F3 formulation; on the flow curve of CSP-F4 formulation (E); and on the flow curve (F) and viscosity curve (G) of CSP-F5 formulation.

Formulations CSP-F1 and CSP-F2 were designed as a mouthwash, thus they were not assayed for extensibility properties. The extensibility was determined by observing the area of extension over the formulation after application of specific weights. As expected, the extensibility values became greater as the weight of the load increased. Figure 3 shows the extensibility results of formulations CSP-F3, CSP-F4, and CSP-F5. Among tested formulations, CSP-F3 exhibited the highest extensibility with an area of $24.35 \pm 1.63 \text{ cm}^2$, followed by CSP-F4 and CSP-F5 with areas of $16.28 \pm 1.52 \text{ cm}^2$ and $11.64 \pm 0.73 \text{ cm}^2$, respectively.

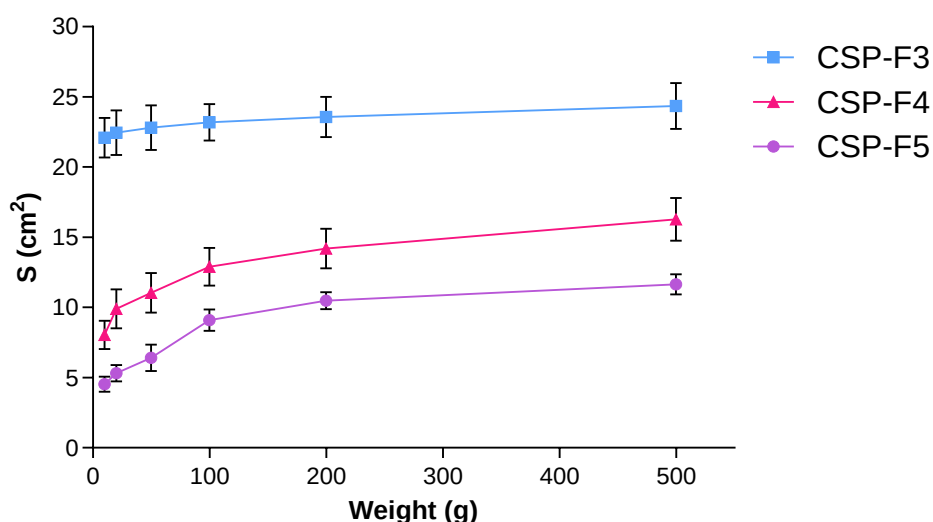


Figure 3. Spreading area (S , cm^2) as a function of weight (g) at 37°C of CSP-F3, CSP-F4, and CSP-F5 formulations. Each value represents the mean $\pm$ SD ($n = 3$).

3.2. Characterization of mucoadhesive properties

Figure 4A, B illustrates the viscosity curves of mucin and mucin-based formulations. The viscosity value for mucin was $0.0076 \pm 0.0044 \text{ Pa}\cdot\text{s}$. The mucin + CSP-F1, mucin + CSP-F2 and mucin + CSP-F4 mixtures presented viscosity values very similar to the mucin value, $0.0067 \pm 0.0046 \text{ Pa}\cdot\text{s}$, $0.0082 \pm 0.0046 \text{ Pa}\cdot\text{s}$ and $0.0084 \pm 0.0054 \text{ Pa}\cdot\text{s}$, respectively. In contrast, the mucin + CSP-F3 and mucin + CSP-F5 mixtures showed much higher values than the mucin itself, the highest value was for mucin + CSP-F5, being $13.2700 \pm 0.1408 \text{ Pa}\cdot\text{s}$, followed by mucin + CSP-F3 with a value of $0.2587 \pm 0.0088 \text{ Pa}\cdot\text{s}$.

Figure 4C represents the ZP values obtained from the mucin solution and the mucin-based formulations. Comparing the value obtained for the mucin with the values achieved for the mucin- formulation mixtures, it was found that the ZP value of the mucin solution ($-10.58 \pm 0.77 \text{ mV}$), became more positive for the mixtures. The ZP values of the mixtures were $-0.49 \pm 0.11 \text{ mV}$,

-0.43 ± 0.07 mV, 50.41 ± 5.49 mV, 1.60 ± 0.46 mV and -1.31 ± 0.35 mV for mucin-CSP-F1, F2, F3, F4 and F5, respectively.

Figure 4D shows the mucoadhesive strength of the formulations on buccal and sublingual mucosae. The trend of the formulations is similar in both tissues. The formulation that exhibited the highest mucoadhesive strength was CSP-F3 with values of 5179.05 ± 31.99 mN/cm² and 7026.10 ± 123.41 mN/cm² for buccal and sublingual mucosa, respectively. The second formulation with the highest mucoadhesion was CSP-F5 with values for buccal and sublingual mucosa of 3665.99 ± 107.20 mN/cm² and 4071.82 ± 91.05 mN/cm², respectively. These results are in line with the data obtained above. CSP-F1 exhibited values for buccal and sublingual mucosa of 2887.65 ± 140.79 mN/cm² and 2208.60 ± 137.69 mN/cm², respectively, followed by CSP-F4 with values for buccal mucosa of 2530.07 ± 139.03 mN/cm² and 2078.32 ± 330.01 mN/cm² for sublingual mucosa. CSP-F2 exhibited values of 2403.32 ± 217.06 mN/cm² for buccal mucosa and 1915.40 ± 122.05 mN/cm² for sublingual mucosa.

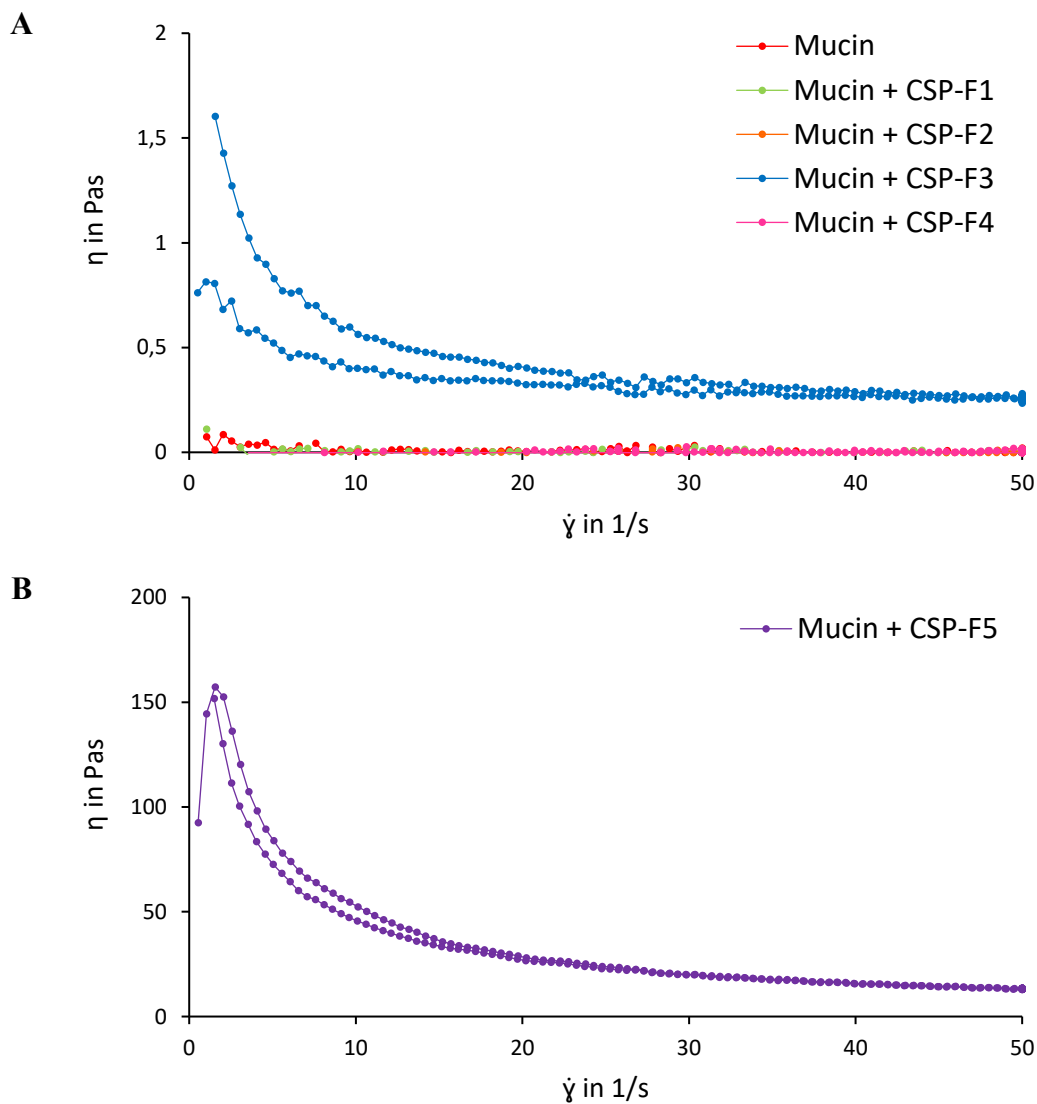
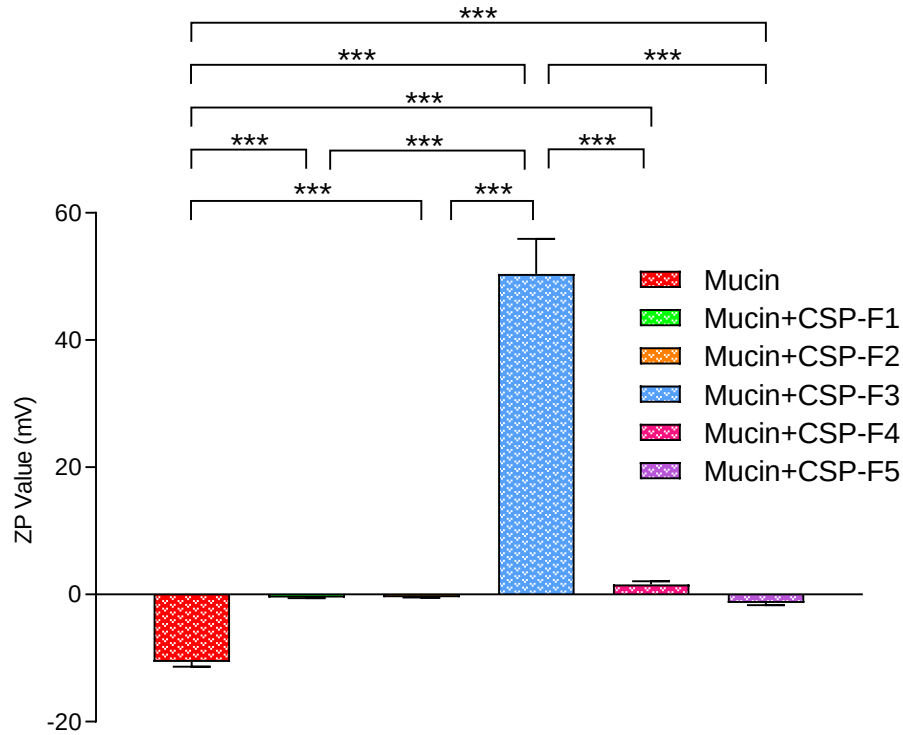


Figure 4. Cont.

C



D

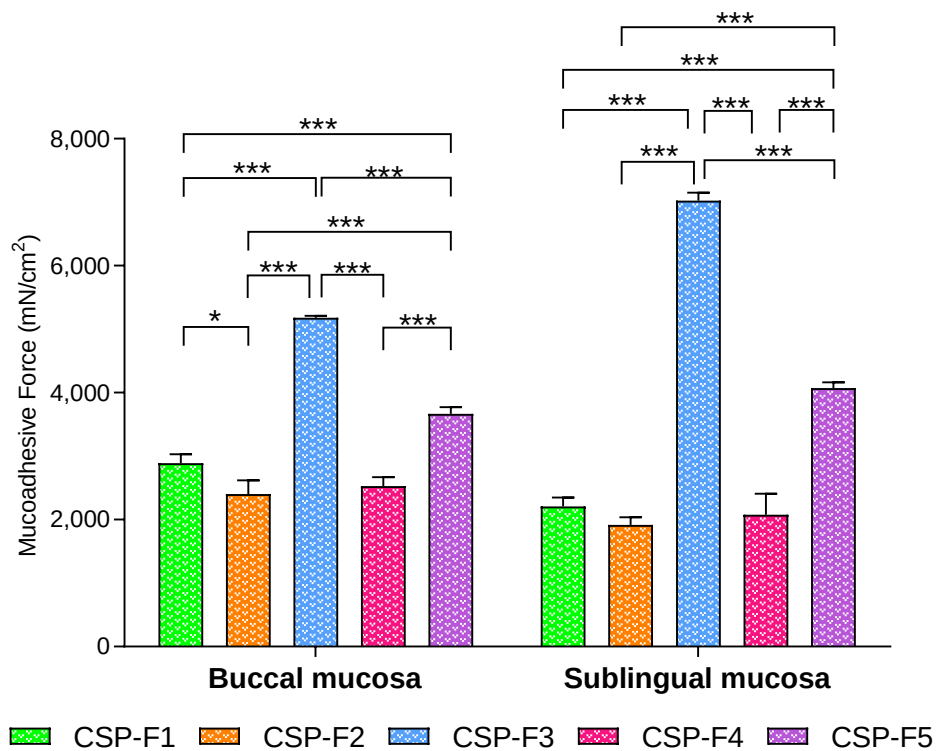


Figure 4. Mucoadhesive properties: (A) and (B) depict the viscosity curves of mucin solution and mucin-based formulations. Each value represents the mean $\pm$ SD ($n = 3$); (C) shows the zeta potential of mucin solution and mucin-formulations. Results are presented as mean $\pm$ SD ($n = 9$); and (D) shows the mucoadhesive force of formulations in buccal and sublingual mucosa. Results are expressed as mean $\pm$ SD ($n = 3$). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

3.3. Transmucosal water loss measurements

Results of the evaluation before (basal) and after application of different formulations, on the buccal and sublingual mucosae at predefined time intervals, are depicted in Figure 5.

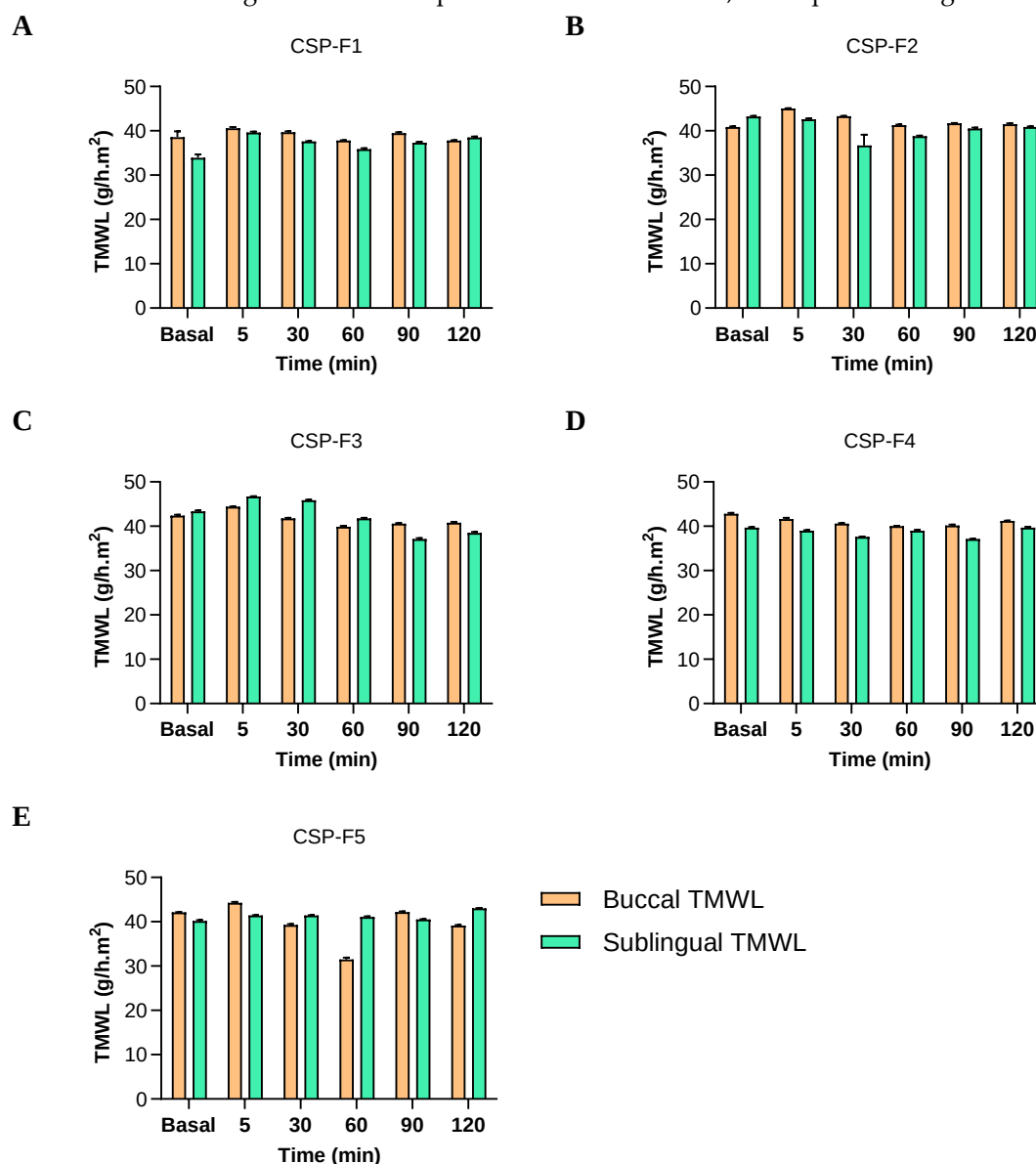


Figure 5. Transmucosal and sublingual water loss (TMWL) values obtained after 2 h application to buccal and sublingual mucosa. Each value represents the mean $\pm$ SD (n = 10).

The values obtained from buccal measurements of CSP-F1 remained constant while sublingual values presented a slight increase 5min after the application and then remained more or less constant during the 2h test ($p < 0.001$). CSP-F2 TMWL data in buccal and sublingual mucosae showed the same trend: an increase at 5min time could be observed, then it reached the lowest value at 60min time ($p < 0.001$) and after 2h became closer to the baseline value ($p < 0.001$).

The results for CSP-F3 in the buccal mucosa slightly increased after 5min and then remained fairly constant at a value close to baseline ($p < 0.001$). For the sublingual mucosa, the general tendency was to remain below the baseline ($p < 0.001$). The values obtained from the CSP-F4 buccal and sublingual TMWL measurements remained constant ($p > 0.05$). For CSP-F5, sublingual TMWL values remained constant throughout time, while there was a decrease in buccal TMWL after 60min ($p < 0.001$), which returned to the baseline after 2h ($p < 0.001$).

3.4. Mucosal hydration measurements

The results of mucosal hydration (MH) measurements before (basal) and after application of different formulations to the buccal and sublingual mucosae at predefined time intervals for 2h are shown in Figure 6. None of the formulations induced changes on the MH, i.e. the basal value of the buccal mucosa remained constant at all times. However, the p -value observed for CSP-F1, CSP-F4 and CSP-F5 was $p>0.05$, $p<0.05$ for CSP-F2 and $p<0.001$ for CSP-F3 during the 2h of the study. In contrast, in the sublingual mucosa all formulations showed certain dehydration over time, with the exception of CSP-F5 ($p>0.05$). Sublingual mucosa treated with CSP-F1 and CSP-F2 tended to stabilize the loss ($p<0.001$). One should emphasize that CSP-F1 and CSP-F2 are mouthwashes, so they remained in contact with the buccal mucosa for a maximum of 10min, during which no change in the tissues was observed. Sublingual mucosa treated with CSP-F3 and CSP-F4 did not regain hydration ($p<0.001$).

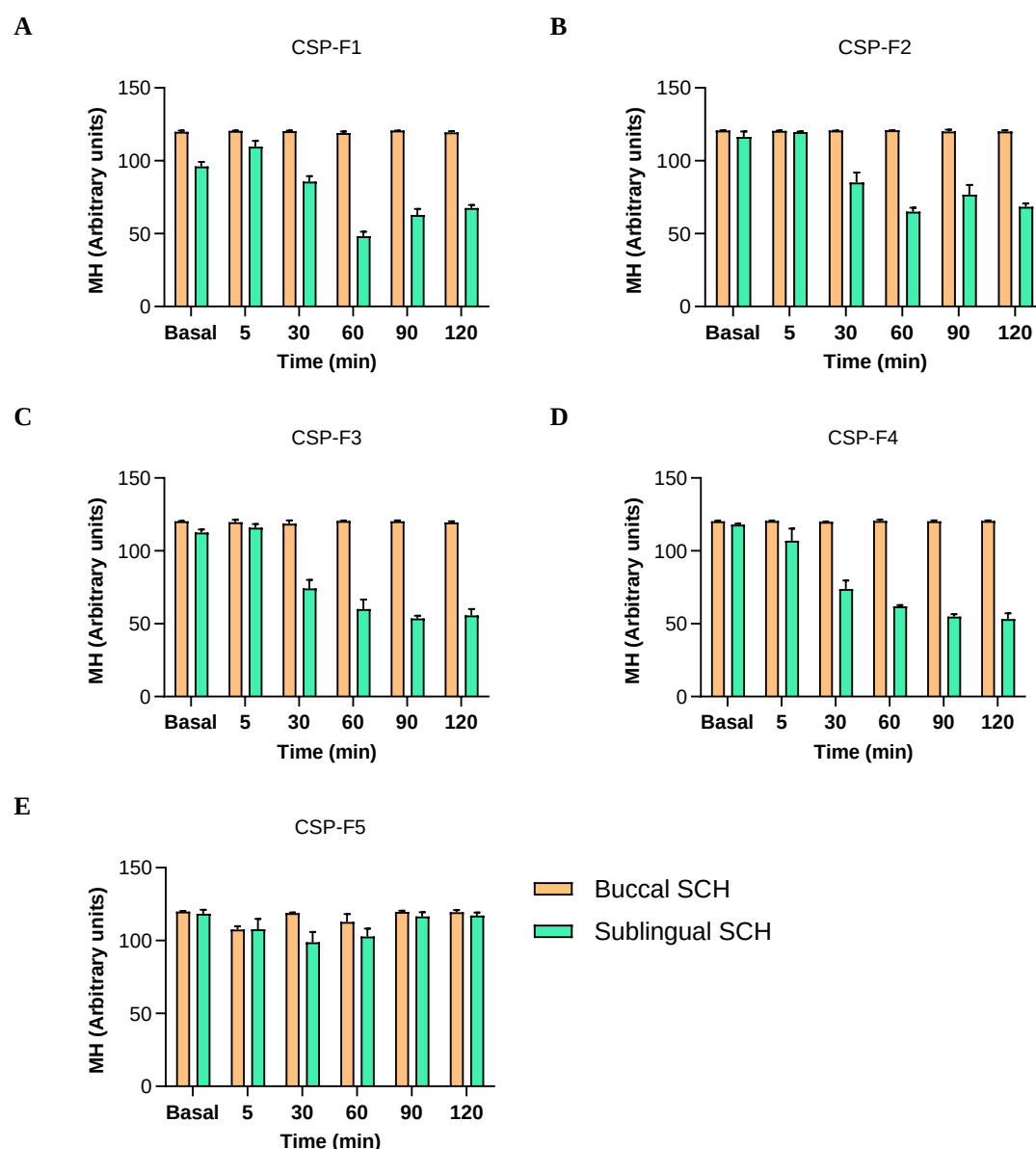


Figure 6. Mucosal hydration (MH) values obtained after 2 h application of the samples to buccal and sublingual mucosa. Each value represents the mean $\pm$ SD ($n = 10$).

3.5. *In vitro* release and kinetic evaluation

Since 95.11% of CSP was recovered after 28 h, no interaction between the drug and the PTFE membrane was seen. Figure 7A displays the *in vitro* release profiles of CSP formulations. After 28

h, CSP-F4 exhibited the highest cumulative drug release, followed by CSP-F2, CSP-F1, CSP-F3, and finally CSP-F5. Since the release profile showed a hyperbolic shape, the data were adjusted to the first-order and hyperbole models, and the best one was chosen on the basis of the R^2 value. The results of model fitting showed that all formulations were adjusted to a One phase exponential association (equation 14):

$$Y = Y_{max} \cdot (1 - e^{-K \cdot X}) \quad (14)$$

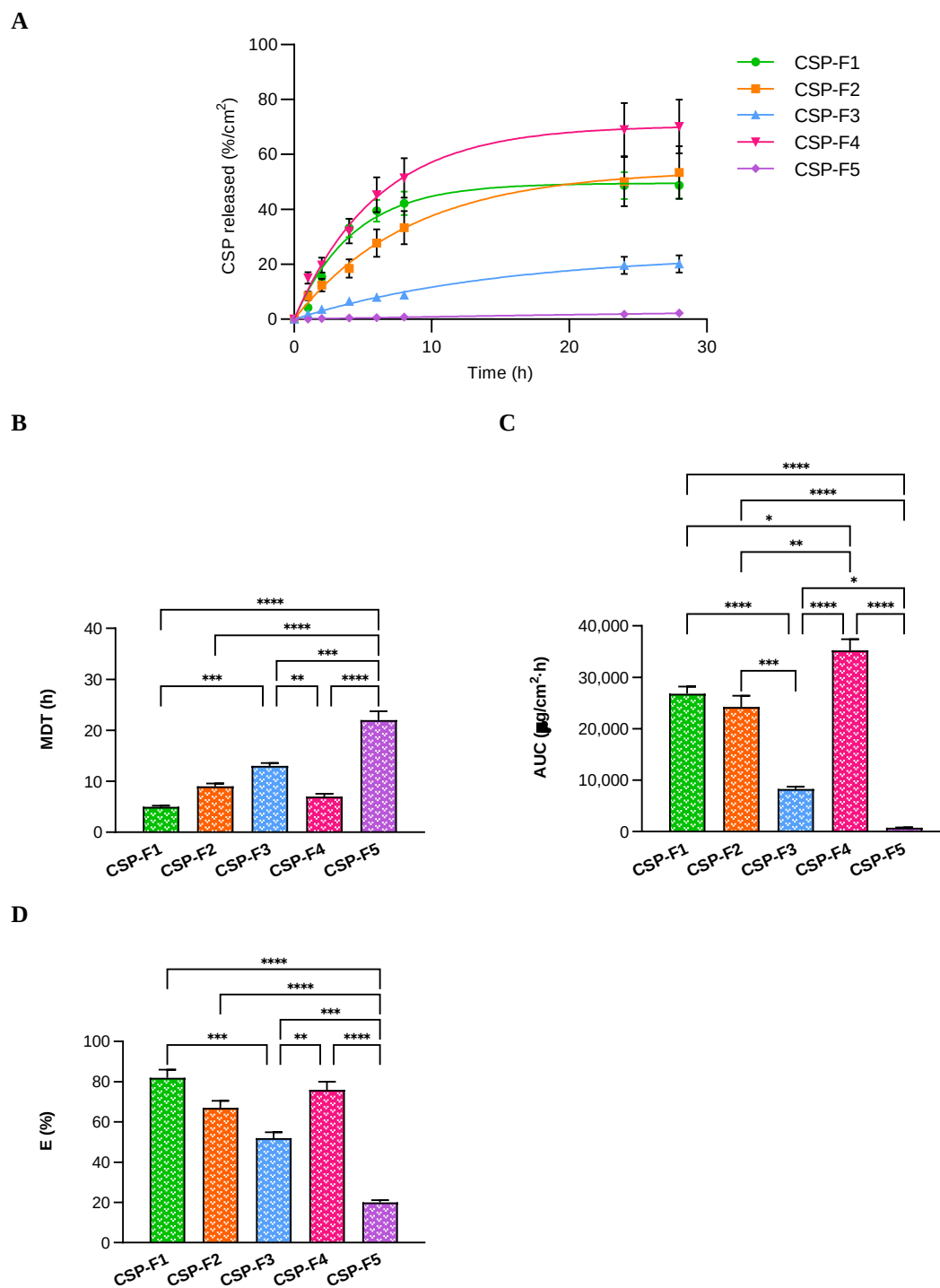


Figure 7. (A) Percentage of CSP released per unit of area as a function of time from formulations, at 32°C. Data represent mean $\pm$ SD ($n = 6$); (B) Non-modelistic parameter of mean dissolution time (MDT) (h); (C) Non-modelistic parameter of area under the curve (AUC) ($\mu\text{g}/\text{cm}^2 \cdot \text{h}$); and (D) Non-modelistic parameter of efficiency (E, %). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$.

The formulation that released the highest amount of drug was CSP-F4, followed by CSP-F2, CSP-F1, CSP-F3 and finally by CSP-F5, this latter with a distinct release profile in comparison to the other four. Yet, the results of fitting model show that all samples could be adjusted to a first-order kinetic model, with the R^2 well above 0.99 (Table 4).

Table 4. Parameters obtained after adjusting the data to the best release model of the formulations.

	CSP-F1	CSP-F2	CSP-F3	CSP-F4	CSP-F5
First-order					
Best-fit values					
Y_{max} ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	1169	1283	567.40	1665	135
K (1/h)	0.233	0.118	0.066	0.166	0.017
Half Life (h)	2.972	5.899	10.430	4.172	41.170
Std. Error					
Y_{max}	52.880	34.490	34.600	36.830	42.030
K	0.030	0.008	0.008	0.010	0.006
R^2	0.9955	0.9990	0.9986	0.9990	0.9992

Some non-modelistic parameters were also calculated, namely, the mean dissolution time (MDT, Figure 7B), the area under the curve (AUC, Figure 7C), and the efficiency (E, Figure 7D). CSP-F5 exhibited the highest value of MDT, 22.47 ± 3.01 h, followed by CSP-F3, CSP-F2, CSP-F4 and CSP-F1, with MDT values of 13.39 ± 1.02 h, 9.10 ± 1.10 h, 7.83 ± 1.05 h and 5.05 ± 0.40 h, respectively. Therefore, the formulation that most quickly released was CSP-F4, suggesting that it may provide improved availability of CSP in the buccal and sublingual mucosa. The AUC results for CSP-F1, CSP-F2, CSP-F3, CSP-F4 and CSP-F5 were 26820.10 ± 2347.10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2\cdot\text{h}$, 24240.27 ± 3781.09 $\mu\text{g}/\text{cm}^2\cdot\text{h}$, 8288.00 ± 751.04 $\mu\text{g}/\text{cm}^2\cdot\text{h}$, 35250.06 ± 3772.53 $\mu\text{g}/\text{cm}^2\cdot\text{h}$ and 746.50 ± 73.92 $\mu\text{g}/\text{cm}^2\cdot\text{h}$, respectively. The highest value was for CSP-F4 and the lowest for CSP-F5. Finally, for the efficiency results, CSP-F1 exhibit the highest value of 81.93 ± 7.30 %, followed by CSP-F4, CSP-F2, CSP-F3 and CSP-F5, with E% values of 75.61 ± 7.53 %, 67.47 ± 6.32 %, 52.17 ± 5.19 % and 19.75 ± 2.04 %, respectively.

3.6. Ex vivo permeability of CSP through buccal and sublingual mucosa

Figure 8 shows the CSP permeability profiles in the buccal and sublingual membranes, respectively. Table 5 shows the estimated kinetics parameters and CSP retained amounts. The highest permeability profile through buccal mucosa was for CSP-F3, showing higher values for flux and permeability coefficient than CSP-F4 and CSP-F5. As CSP-F1 and CSP-F2 spent such a short time in contact with the tissue, no permeability data were recorded for these two formulations. In contrast, in sublingual mucosa, the formulation showing the highest flux and permeability coefficient (Table 5) was CSP-F5, followed by CSP-F3. Both were the only samples able to permeate through this tissue. The flux at the steady state was calculated within the linear part of the permeability profile (3-6h). The theoretical human plasma steady-state concentration (C_{ss}) that would be achievable by CSP was calculated. This was done by taking into account the plasma clearance (C_{lp}), 0.55 L/h (Borsuk-De Moor et al. 2020), and the application area, i.e. 18 cm² for buccal mucosa and 9 cm² for sublingual mucosa.

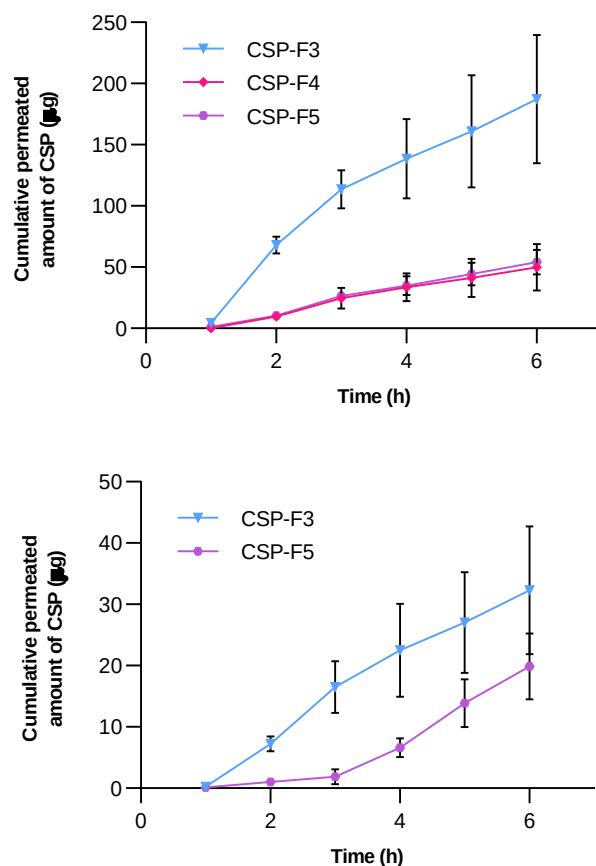


Figure 8. Cumulative amounts of CSP released from: (A) buccal mucosa; and (B) sublingual mucosa. Data represents mean $\pm$ SD (n = 5).

The amount of CSP that remained retained in the different tissues (buccal and sublingual) was also calculated (Figure 9).

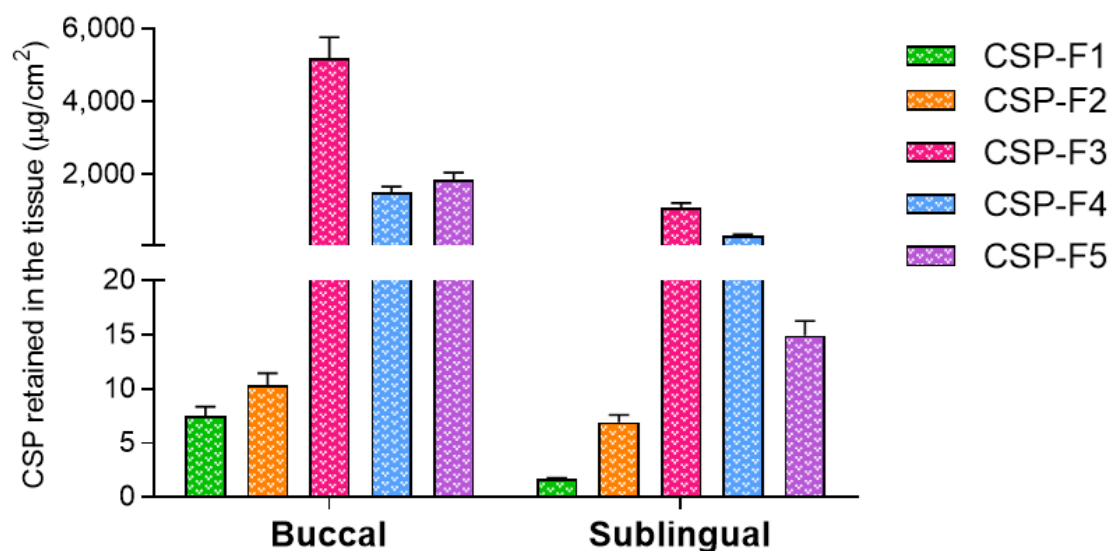


Figure 9. Amount of CSP extracted from buccal and sublingual mucosa, upon applications of the five developed formulations. Data represent the mean $\pm$ SD (n = 5).

Table 5. Estimated permeability and retention parameters of CSP-loaded formulations. Values are reported as the mean $\pm$ SD ($n = 5$). J : flux; K_p : permeability coefficient; T_L : lag-time; C_{ss} : predicted plasma concentration at the steady-state, and Q_r : amount of CSP retained in the mucosa.

Parameter	Buccal mucosa					Statistics
	CSP-F1 ¹	CSP-F2 ²	CSP-F3 ³	CSP-F4 ⁴	CSP-F5 ⁵	
J ($\mu\text{g}/\text{h}$)	-	-	24.55 ± 2.65	8.80 ± 0.79	9.60 ± 0.87	**** 3 vs 4; 3 vs 5
$K_p \cdot 10^{-4}$ (cm/h)	-	-	19.18 ± 1.87	6.87 ± 0.77	7.50 ± 0.66	**** 3 vs 4; 3 vs 5
T_L (h^{-1})	-	-	0.38 ± 0.01	-	0.37 ± 0.02	n.s. 3 vs 5
C_{ss} ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	-	-	1.26 ± 0.01	0.45 ± 0.04	0.49 ± 0.04	**** 3 vs 4; 3 vs 5
Q_r ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	7.53 ± 0.81	10.30 ± 1.14	5183.24 ± 587.32	1509.82 ± 147.23	1852.10 ± 193.24	**** 3 vs 4; 3 vs 5 ** 1 vs 2
Parameter	Sublingual mucosa					Statistics
	CSP-F1 ¹	CSP-F2 ²	CSP-F3 ³	CSP-F4 ⁴	CSP-F5 ⁵	
J ($\mu\text{g}/\text{h}$)	-	-	5.02 ± 0.47	-	6.64 ± 0.65	** 3 vs 5
$K_p \cdot 10^{-4}$ (cm/h)	-	-	3.92 ± 0.35	-	5.18 ± 0.45	** 3 vs 5
T_L (h^{-1})	-	-	-	-	3.01 ± 0.14	N/A
C_{ss} ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	-	-	0.13 ± 0.01	-	0.17 ± 0.01	*** 3 vs 5
Q_r ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	1.64 ± 0.14	6.90 ± 0.67	1090.72 ± 110.26	317.74 ± 31.78	14.91 ± 1.35	**** 3 vs 4; 5 vs 5 **** 1 vs 2

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.0001$, **** $p < 0.0001$, n.s.: no statistically significant, N/A: Not applicable.

Values are reported as the mean $\pm$ SD (n = 5). J: flux; K_p : permeability coefficient; T_L : lag-time; C_{ss} : predicted plasma concentration at the steady-state, and Q_r : amount of CSP retained in the mucosa.

3.7. *Ex vivo* histological evaluation

Under control conditions, pig sublingual mucosa shows a stratified squamous epithelium, followed by the lamina propria which inserts up into the epithelium in finger-like projections (Figure 10A). In ethanol-treated mucosa, the dehydration of the tissue can be visualized by the bleach in epithelium (Figure 10B). The formulations induced slight changes to the epithelium, except CSP-F1 and CSP-F4, which did not show affected areas, and were similar to control conditions (Figure 10C, F). In CSP-F2, a contraction of the epithelium with loss of finger-like projections could be observed (Figure 10D). CSP-F5 (Figure 10G) showed some small areas with bleached epithelium, whereas in CSP-F3 (Figure 10E) the presence of a layer above the epithelium, explained by the high mucoadhesive capacity of the formulation without affecting the tissue below, could be observed. The adjacent tissue was not affected and preserved the characteristic finger-like projections.

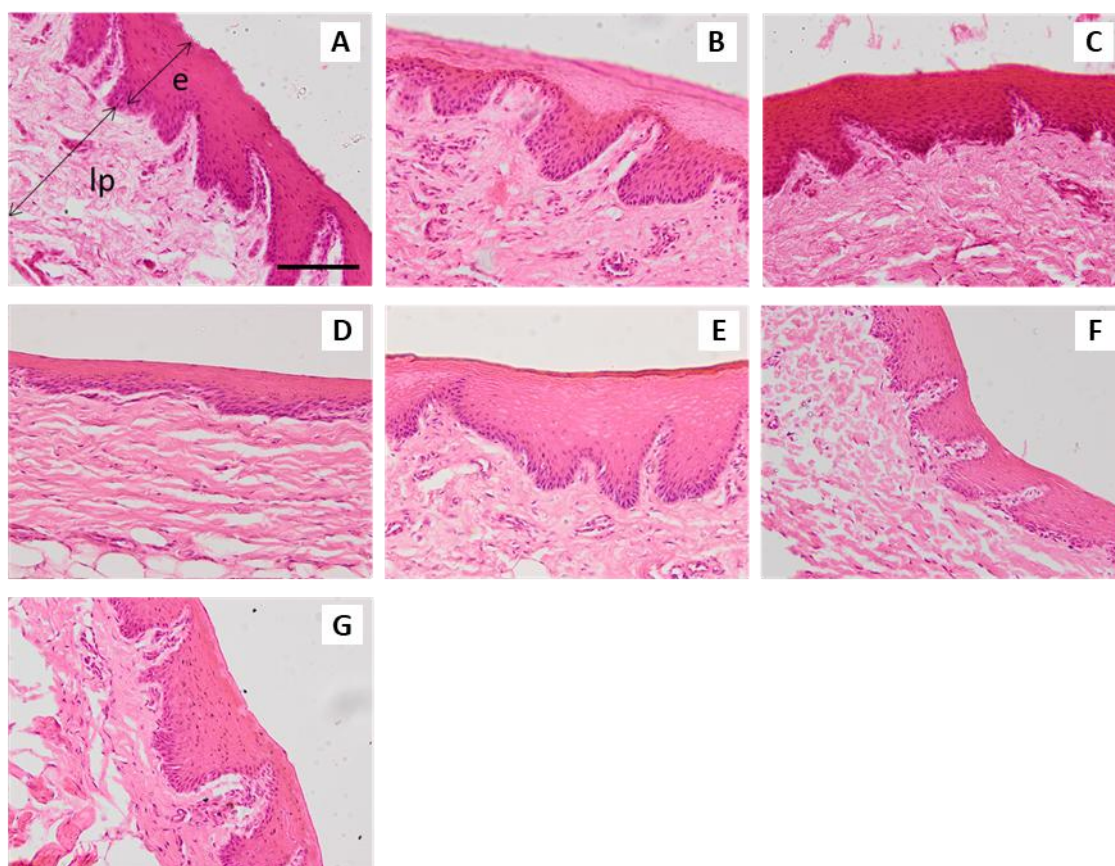


Figure 10. Representative histological sections of pig sublingual mucosa under magnification x200: (A) Control conditions; (B) Treated with ethanol; (C) Treated with CSP-F1; (D) Treated with CSP-F2; (E) Treated with CSP-F3; (F) Treated with CSP-F4; and (G) Treated with CSP-F5. Mucosal structures: e) Stratified squamous epithelium; lp) Lamina propria. Scale bar=100 μ m.

The same treatments were applied to the buccal mucosa and the tissue sections are shown in Figure 11. In control conditions (Figure 11A), the buccal mucosa is covered by different layers of squamous stratified epithelium. The epithelium of the buccal mucosa treated with ethanol (Figure 11B) shows evident alterations with loss of the uppermost layers. The treatments with

CSP- F1 (Figure 11C) and CSP-F5 (Figure 11G) did not induce changes to the tissue. In less magnitude, CSP-F2 (Figure 11D) and CSP-F4 (Figure 11F) also display some alterations similar to the ethanol treatment (Figure 11B). In the case of CSP-F3 (Figure 11E), again the layer above the epithelium could be observed and the mucosa seems affected by the treatment.

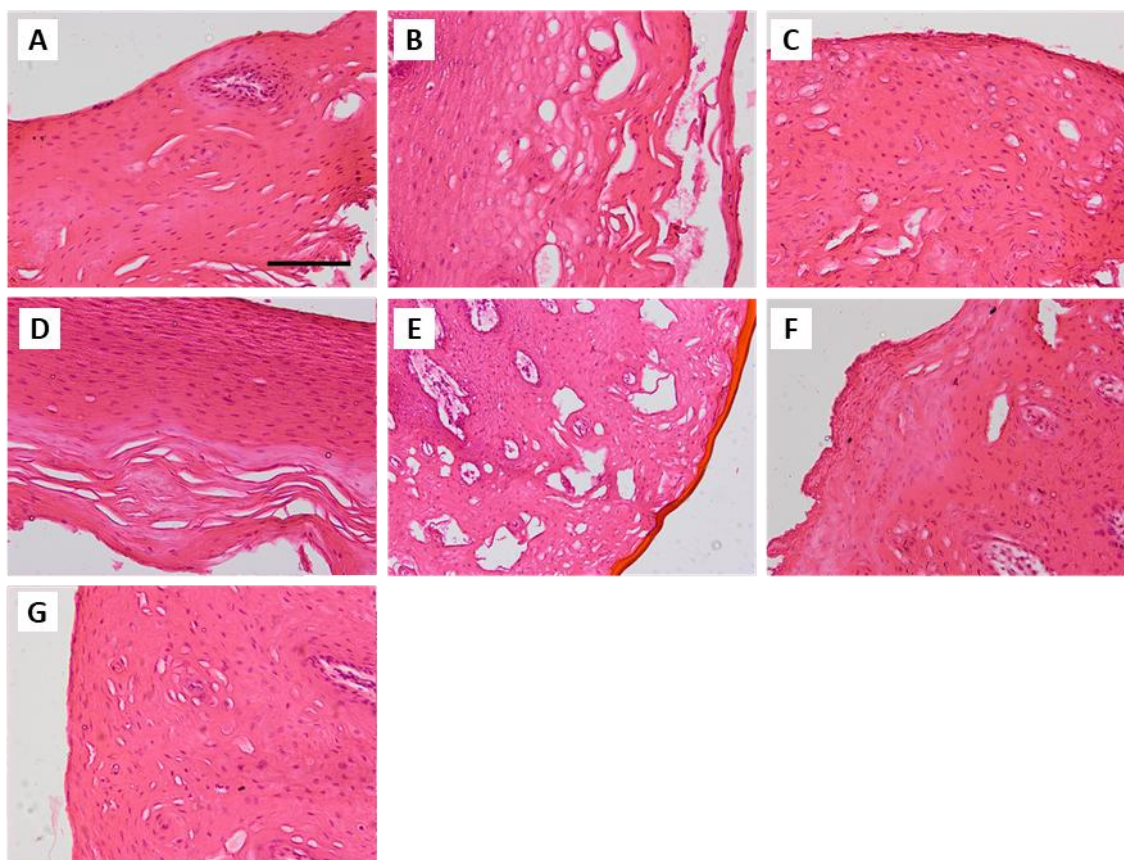


Figure 11. Representative histological sections of pig buccal mucosa under magnification x200: (A) Control conditions; (B) Treated with ethanol; (C) Treated with CSP-F1; (D) Treated with CSP-F2; (E) Treated with CSP-F3; (F) Treated with CSP-F4; and (G) Treated with CSP-F5. Scale bar=100 μ m.

3.8. Antifungal activity

The purpose of this trial was to evaluate the efficacy of formulations against fungi. CSP is a representative of the echinocandin class of antifungal agents that are active against many strains of *Candida* and *Aspergillus* (Odds F. C. et al. 2004). The antimicrobial efficacy was assessed by considering the no-growth areas to determine whether or not they are useful against the microorganisms studied. The results obtained after testing formulations with CSP are shown in Table 6.

The results show that the formulations are effective against the tested microorganisms, with the exception of *C. Auris*, for which an overgrowth was observed at 48h in the zone of inhibition generated in the first 24h. The CSP-F3 formulation stands out as the most effective one amongst all evaluated formulations, due to its remarkable ability to generate larger inhibition zones. This superior behaviour is not solely attributed to the presence of CSP but also to chitosan, known for its antifungal properties against a wide variety of microorganisms, including bacteria, fungi and yeasts (Sahariah and Másson 2017).

Table 6. Size of inhibition areas of CSP from the developed formulations, against different yeasts.

Yeast tested	Origin	Inhibition zone diameter (mm)					Statistics
		CSP-F1	CSP-F2	CSP-F3	CSP-F4	CSP-F5	
<i>C. albicans</i>	ATCC	27.03 ±	26.09 ±	30.19 ±	25.70 ±	26.39 ±	*2,5 vs 3; **3 vs 4
	10231	1.39	0.55	0.95	2.26	3.45	
<i>C. tropicalis</i>	ATCC	30.56 ±	27.41 ±	30.89 ±	27.08 ±	26.97 ±	*1 vs 5; 3 vs 4,5
	7349	1.42	0.68	1.12	2.40	3.43	
<i>C. glabrata</i>	ATCC	34.86 ±	32.48 ±	36.58 ±	30.50 ±	31.40 ±	*1 vs 5; **1 vs 4; 2 vs 3; ***4,5 vs 3
	66032	1.45	0.04	1.97	2.25	2.66	
<i>C. parapsilosis</i>	ATCC	29.38 ±	26.71 ±	30.07 ±	26.99 ±	26.92 ±	*1 vs 2,4,5; **3 vs 2,4,5
	22019	2.61	1.14	0.80	0.81	0.67	
<i>C. auris</i>	DSM 21092	0	0	0	0	0	-

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

4. Discussion

In the design of drug delivery systems, the selection of the best excipients that make up the formulation is essential. ASM was selected as ingredient for the first mouthwash formulation since it provides a better simulation of the natural saliva environment, which can enhance the accuracy of results in studies related to oral and mucosal health. Furthermore, artificial saliva can aid in maintaining oral homeostasis, providing a more physiological and versatile alternative to a phosphate buffer, making it ideal for applications in medical and dental product research and development. Mucin in the mouth performs several important functions. Primarily, it helps lubricate and protect the mucous membranes of the mouth and throat, facilitating the movement of food and swallowing. Additionally, it forms a protective barrier that helps prevent dehydration and protects against irritation and infections. It also plays a significant role in the formation of dental biofilm, guarding against cavities and other oral diseases (Frenkel and Ribbeck 2015). Simple syrup with HA was used to improve the organoleptic properties of the second mouthwash formulation. CHTS was selected based on their biocompatibility and intrinsic antifungal and mucoadhesive properties of hydrogels (Genesi et al. 2023). P407 was used because it is able to exhibit sol-to-gel transitions when applied at the body temperature (de Castro et al. 2023; Galindo-Camacho et al. 2023; Galocha-León et al. 2023) and Orafix® because it is a widely used oral adhesive paste.

For all dosage forms, CSP acetate was selected since it and is available for hospital use, yet for intravenous administration only (McCormack and Perry 2005). To our knowledge, no previous data are available in the literature recommending the most appropriate topical concentration of CSP for the treatment of oral candidiasis, as a complication of chemotherapy or radiation-induced oral mucositis. However, from our conducted literature search on topically administered antifungals, the most recurrent concentration found was 2%. In different keratitis studies, CSP has been used at concentrations ranging from 0.5 to 1% with promising results (Hurtado-Sarrió et al. 2010; Neoh et al. 2011). Taking into account the high rate of resistance of topical infections against *Candida* spp., *Aspergillus* spp., and dimorphic or filamentous fungi, the use of CSP at 2% could be an option to consider, especially if the formulation can be physicochemically stabilised in the long-term. On the other hand, the limited systemic absorption observed with CSP in previous studies has also be taken into account (Ruiz- Camps and Cuenca-Estrella 2009). The use of 2% CSP was suggested on the basis of recently published results for several topical applications (Pérez-González et al. 2021; 2023).

The pH value of topical formulations was also evaluated in view of its many important implications on the stability of the drug and the formulation. The only formulation that kept the pH unchanged was CSP-F3, which was attributed to the solubility of CHTS that depends on the degree of deacetylation and the distribution of the acetyl and amino groups along the chain, being soluble at pH lower than 6. The optimal pH for the treatment of oral candidiasis typically falls within the range of 5.5 to 7.5. However, it is important to note that individual responses to pH levels can vary, so it may be necessary to adjust specific pH targets based on the severity of the infection and other factors. Yet, an acidic medium is required. In this acidic medium, the amino groups of CHTS are protonated, becoming CHTS a soluble cationic polyelectrolyte because the ionized amines form hydrogen bonds with the carboxylic acids (Wang et al. 2020). Regarding the drug, CSP molecule presents two acetate anions and two protonated amines as cations. Under extremely high pH conditions, these amines can undergo protonation, becoming free amines and resulting in a neutral or more basic compound. However, at physiological conditions, the pH is not sufficiently high for this process to occur. On the other hand, hydroxyl and amide groups will remain stable in an acidic environment. Regarding the amino charge and forming the salt again. In our case, the salt remains unchanged, as the acid used in the preparation of the chitosan gel is acetic acid, meaning that the formulation's pH does not affect the studied active principle.

The study of the rheological properties of a topical product is instrumental to succeed in formulation development, as they affect not only the production process, packaging and physical stability of the product, but also its dispensing, sensory properties and the in vivo drug performance (Berenguer et al. 2020). Due to their low viscosity, CSP-F1 and CSP-F2 can be considered suitable for mouthwash and for in situ buccal spraying. The decrease of viscosity with the increasing of the shear rate and time of CSP-F5 formulation suggests certain advantages for topical application. Firstly, the product should flow easily and facilitate application when removed from the container. After spreading the product dose on the site of administration, the product will recover its higher consistency. Secondly, the formation of a stable and consistent film, covering the area upon the product application, may increase the drug contact time and allow the diffusion of the drug through the matrix (Soriano-Ruiz et al. 2020; El Moussaoui et al. 2021). Despite having a lower viscosity, CSP-F3 suggests the same interest as CSP-F5 for topical application. CSP-F4 formulation is liquid at low temperatures and generates a gel in situ at the body temperature (Soriano et al. 2020; Galindo-Camacho et al. 2023). The gelation process provides the advantage of an increased residence time of the formulation (Galindo-Camacho et al. 2023). P407 is a triblock copolymer comprised of a hydrophobic polypropylene oxide (PPO) center block and two hydrophilic polyethylene oxide (PEO) blocks (Fakhari et al. 2017). Aqueous solutions of P407 exhibit reversible gelation, characterized by a sol-gel transition temperature ($T_{sol-gel}$). Below this temperature, P407 solutions remain fluid, while above it they transform into a semi-solid state. Thermo-gelation is driven by hydrophobic interactions among the P407 copolymer chains, leading to micellar aggregation as the temperature increases. This micellization process results from the dehydration of the hydrophobic PPO blocks (Fakhari et al. 2017).

Sample spreading properties are key parameters for evaluation of topical forms because they have an effect on the uniformity of dose and application and, thus, on the therapeutic efficacy. As seen in Figure 3, CSP-F3 showed the highest extensibility, which would facilitate application to the buccal mucosa, an area where the application of any topical formulation is complex. Furthermore, CSP-F3 hydrogel could be a promising formulation for the treatment of oral candidiasis, in particular in very localized areas, because it will improve mucosal adhesion and prolong drug retention due to the mucoadhesive properties of CHTS. This formulation is a hydrogel which, when used in combination with CSP-F1 or CSP-F2, would improve the therapeutic outcomes.

Mucoadhesion is essential in oral formulations due to the washing out promoted by salivation process and the movements generated by the tongue. The formulations could adhere to mucosal substrates because of the presence of mucoadhesive polymers. The interaction of mucin with formulations could increase viscosity and form a gel, which may be responsible for their mucoadhesive properties. Figure 4A, C illustrates that CSP-F3 showed the highest viscosity value. This is attributed to the presence of CHTS, which binds via non-covalent bonds to the cross-linked mucin chains (Rossi et al. 2014). The mucoadhesion is a result of the interactions between the mucosa's mucin and the polymers, and can be estimated by variations on the zeta potential (ZP) values. There is a correlation between the ZP values and detachment force, thus, the polymer charge has a great influence on mucoadhesivity. The increase in ZP value is due to interactions between negative groups of the mucin, such as carboxylate or sulphonate, with positive groups of the polymers that comprise the different formulations (Gosecka and Gosecki 2021). CHTS is a polymer capable of neutralizing the charge of mucin due to its cationic nature. Orafix®, the major component of CSP-F5, is an oral adhesive paste and was therefore expected to exhibit excellent mucoadhesion. Finally, Figure 4D shows that CSP-F3 exhibited the highest mucoadhesive strength, demonstrating the intrinsic mucoadhesive properties of the CHTS (Takeuchi et al. 2005; Saikia et al. 2015). The different characterization techniques used in our work show that the CSP-F3 formulation is the most mucoadhesive and therefore the one that would remain in the mucosa for the longest time.

Transepidermal water loss (TEWL) is a well-recognized method to evaluate the integrity of the skin barrier function and can be also extended to evaluate the integrity of the mucosal barrier. Transmucosal water loss (TMWL) is a measurement that can be used as an indicator of the biological function of these mucous membranes. The buccal TMWL value has been described in the literature (Amores et al. 2014). However, there are no known studies that describe sublingual TMWL values, which makes our study also pioneering in reporting these results. Generally, the values obtained from TMWL measurements, for both tissues, after application of the formulations for 2h, are considered acceptable for tissue integrity.

Pharmacotherapy increases the risk of oral health problems by drying out the oral mucosa. In view of the results obtained for the buccal mucosa, none of the formulations change the mucosal hydration, as the basal value of the buccal mucosa remained constant at all times. In contrast, in the sublingual mucosa, all formulations except CSP-F5 show certain dehydration over time. The dehydration observed in the sublingual mucosa can be attributed to structural differences between this mucosa and the buccal mucosa, taking into account that the sublingual mucosa has a thinner structure compared to the buccal mucosa. The sublingual mucosa has less tissue to retain moisture thus offering an effective barrier against water loss.

The profiling of the drug *in vitro* release serves as a crucial source of information regarding the efficiency of the drug delivery system. Release studies can be employed for quality control purposes, aiding in the anticipation of *in vivo* performance and facilitating a deeper analysis of the underlying mechanisms (Alvarado et al. 2015). The results of model fitting show that all samples could be adjusted to first-order kinetic model (Table 4). In this model, the release rate is directly proportional to the remaining drug concentration. Therefore, the formulations are able to release the incorporated CSP, and the permeability of CSP through the buccal mucosa would not be limited by this factor because the drug undergoes an initial fast release; thus, it is readily available for diffusing through the mucosae at the early times (Mallandrich et al. 2017). The release profile studied in Franz diffusion Cells, using PTFE membranes, to primarily assesses the drug's ability to be released from the excipients, and no correlation with *ex vivo* permeability should be expected. Yet, and since the formulation excipients themselves influence the release, they may also have an effect on the permeation across biological membranes. The main component of CPS-F4 is P407, which is well-known to form micellar structures. CPS-F4 is the

formulation that released higher amount of drug, suggesting that CSP is not strongly retained in the micelles, resulting in a fast drug release (Shaarani et al. 2017). Formulation viscosity is a critical parameter that can affect the delivery and absorption of drugs through mucosa. Our results showed an inverse relationship between formulation viscosity and drug release. As the viscosity of the topical formulation increased (CSP-F3 and CSP-F5), the rate of drug release decreased. The higher the viscosity, the more pronounced the hindrance to drug diffusion, resulting in a poor release profile. This finding is consistent with results obtained by other researchers (Tas et al. 2007).

The choice of the vehicle, polymer or gelling agent in topical formulations plays a crucial role in determining drug release kinetics, penetration, and overall therapeutic efficacy. Our experimental data reveal distinct drug release rates between hydrogel formulations (CSP-F3 and CSP-F4) and paste formulation (CSP-F5), highlighting the influence of the polymer nature on the release kinetics. CSP-F5, characterized by a grease-base nature, exhibited a slower drug release compared to hydrogels (CSP-F3 and CSP-F4), which are composed of a hydrophilic polymer base. This trend was also observed by Yener et al. (2009); in their study the researchers compared the drug release from formulations with different vehicles (oil-in-water, water-in-oil or water-in-oil-in-water emulsions and a hydrogel). The authors concluded that higher amounts of oil phase led to a poorer drug release (Yener et al. 2009).

The oral cavity is a non-invasive route of administration that can provide both local effects and systemic effects. Fungal infections, especially *Candida* spp. colonize the mucosal surface, so it is essential to show that the therapeutic effect is local (Zhou et al. 2021). The most external layer of the oral cavity is characterized by a stratified squamous epithelium, while the most internal layer is composed of the basal membrane, lamina propria and submucosa, and is considered to be much more permeable than the skin (Galey et al. 1976). The oral cavity for drug delivery provides numerous advantages due to the high vascularization with venous blood; however, it has the limitation associated to the physiological phenomena of swallowing and salivation that may cause drug loss (Martin et al. 2003; Patel et al. 2011). In the view of a buccal local effect without systemic effects, the permeability of the drug through the buccal and sublingual mucosa should be limited, to reduce the risk of the drug reaching therapeutic plasma concentrations levels; thus, mucosae should be able retain CSP within their structures. C_{ss} is useful to predict the plasma concentration that would be reached at the steady-state after the topical application. In this work, the estimated C_{ss} values were below 2 $\mu\text{g/mL}$, taking into account that the systemic therapeutic levels of CSP are within the range between $C_{min} = 3.55 \mu\text{g/mL}$ and $C_{max} = 11.73 \mu\text{g/mL}$ (Borsuk-De Moor et al. 2020). Thus, no systemic effects would be expected after the application of the developed formulations to the buccal and sublingual mucosae. But a local effect may occur since CSP is retained in these tissues. To our knowledge, no previous studies have been carried out where the permeability parameters of CSP through porcine buccal and sublingual mucosa have been determined. The purpose of the *in vitro* permeability test is to assess the rate and extent of a drug diffusing into and through a biological membrane. Porcine buccal mucosa was proposed as a biological membrane for the study because of its similarity in morphology and properties to human buccal mucosa (Martín-Villena et al. 2013; NIH 2017). Several media, including ASM, were tested as potential receptor fluids. However, ASM was excluded as a receptor fluid due to observed analytical interferences caused by the mucin content in the medium. Moreover, this medium has a certain viscosity that makes difficult to handle the samples. On the other hand, *Candida* spp. optimal growth conditions are known to be within the pH range of 5.1-6.9 (Odds Frank C 1988). It is known that immunodeficient patients are more prone to be affected by *Candida* infections because, generally, the pH of the oral cavity of these patients is slightly acidic. Some authors relate the decrease in the oral cavity pH to *Candida* infections (Baliga et al. 2013). Besides, proteases and lipases seem to be more active within the pH

5-6.5, whereas at the pH of 7.5 their activity decreases (Ramos-Pardo et al. 2023). All this together, and based on the preliminary studies we conducted, led us to consider that the physiological saline solution, which is slightly acidic would be more relevant and representative for testing CPS permeability. Physiological saline solution was thus selected as the receptor fluid. It is also important to keep sink conditions throughout the *ex vivo* permeability test to prevent saturation of the medium and to ensure the concentration gradient across the membrane, which promotes continued drug permeability, and this was achieved with physiological saline solution.

The diffusion of a given drug across mucosa is mainly driven by Fick's first law, i.e. $J = \left(\frac{D \times P}{h}\right) \times C_d$, where J is amount of drug that passes through the mucosa per unit of time and area (flow), D is the diffusion coefficient of the drug through the mucosa, P is partition coefficient between mucosa and vehicle, h is thickness of the mucosal layer and C_d is the drug concentration in the vehicle. Concerning the permeability parameters, although the thickness of the mucosa plays an inverse impact on the permeability (i.e. the thicker the mucosa, the lower the diffusion), and taking into account that the sublingual mucosa thickness is 100 and 200 μm and the buccal thickness is 500 and 800 μm (Guo and Pratap Singh 2019), it may be expected a higher permeability of CSP through the sublingual mucosa. However, our results showed the opposite behaviour i.e. CSP-F3 exhibited higher values for flux and permeability coefficient, leading us to consider that the diffusion of a drug across mucosae also depends on the physicochemical properties of the drug, as well as on the interaction of the drug with the mucosa, potentially due to the ability of CHTS to interact with the epithelial tight junctions (Dodane et al. 1999). Thus, it becomes evident that the partition coefficient plays an important role in the diffusion of CSP into and through the tissues, probably due to the structural differences between both mucosae. Differences in the lag time between buccal and sublingual mucosa were also observed, especially for CSP-F5 whose lag time in the buccal mucosa was less than half an hour, yet, increased up to 3h in the sublingual mucosa, indicating that CSP-F5 required a longer time in the sublingual mucosa to reach the steady-state and hence, the drug to permeate at a relatively constant rate. Additionally, CSP-F3 showed the highest amount of drug retained in both tissues, buccal and sublingual, suggesting that this is the best formulation in targeting the drug into the tissue and hence promote a local action. The dose of CSP applied onto the donor compartment was 6 mg and, for all formulations, the amount of permeated was found to be below 250 μg , thus, below 10%. On the other hand, the amount of CSP retained in the mucosae for CSP-F3 was most of the applied dose, suggesting that the buccal mucosa could promote a reservoir effect for CSP-F3.

Histological findings from our study shed light on the effects of different formulations (CSP-F1 to CSP-F5) on mucosal epithelium. Interestingly, both CSP-F1 and CSP-F4 did not show any damaging effects on the mucosal epithelium. However, CSP-F2 and CSP-F5 appeared to induce alterations, suggesting potential adverse effects. Notably, CSP-F3 affected the buccal and sublingual mucosa differently. These results underscore the importance of understanding the specific impacts of formulations on different regions of the oral mucosa. In addition to the thickness differences (Guo and Pratap Singh 2019), there are notable differences in cellular composition between buccal and sublingual tissues. The buccal tissue primarily consists of connective tissue and striated muscles, with a non-keratinized stratified squamous epithelium lining the superficial layer. In contrast, the sublingual tissue is mainly composed of glandular epithelial cells specialized in saliva production, organized into acini and ducts forming the sublingual salivary glands (Ibáñez-Cortés et al. 2023). This structural disparity underscores the different functions of these regions, with the sublingual tissue primarily serving a secretory function due to its extensive salivary gland presence, while the buccal tissue lacks this primary secretory role. When compared to the TMWL results, one should also highlight that these latter refer to a preliminary guide to identify potential external damage to the mucosae, which were exposed to formulations only for a period of 2 h. On the other hand, the histology study was done

in porcine buccal and sublingual mucosa tissues after 6 h of exposure to the formulations, a period closer to the regular application conditions of each topical dosage form. Histological analyses offer a deeper understanding of the potential damage caused by the formulations, allowing for the detection of more subtle cellular and structural changes than TMWL. While our *ex vivo* study indicates that most formulations can induce alterations in the epithelium, further *in vivo* studies will validate these findings and ascertain whether similar results are observed in living organisms. Understanding the effects of formulations on different regions of the oral mucosa is crucial for the development of safe and effective treatments.

The antimicrobial efficacy study demonstrated that CSP-loaded formulations are valid on the different tested *Candida* spp, producing wide areas of inhibition that confirm the efficacy of the developed products. Despite *C. auris* DSM 21092, although they strongly inhibit at 24 h of incubation, a small resistant growth was found in the initial inhibition area at 48 h proving not to be as effective in eliminating this strain. Yet, all CSP-loaded formulations would be useful in the treatment of oral candidiasis, as they have been effective in eliminating four of the *Candida* spp. tested.

5. Conclusions

Five formulations composed of different excipients have been developed and thoroughly characterized for oral mucosal application. For lesions that are localized, a gel (CSP-F3 or CSP-F4) or a paste (CSP-F5) may be necessary, whereas a mouthwash (CSP-F1 or CSP-F2) would be the best option in cases where the lesions are widespread, or when large area of the mucosa is affected. The formulations exhibited effectiveness against *Candida* spp., suggesting their potential utility in treating both oral mucositis and candidiasis.

Both mouthwash formulations (CSP-F1 and CSP-F2) can be proposed for usage together with one of the semi-solid formulations. CSP-F2 is considered suitable for situations requiring ingestion of the formulation, owing to its favourable organoleptic properties. The CSP-F3 formulation stands out as the most effective amongst all developed formulations due to its remarkable ability to generate larger inhibition zones. This superior profile is not solely attributed to the presence of caspofungin but also to chitosan, known for its antifungal properties. The combination of caspofungin and chitosan in the CSP-F3 formulation acts synergistically to enhance antifungal activity, resulting in greater efficacy in inhibiting the growth of four out of the five tested *Candida* species. It also had the highest penetration and retention of CSP in the buccal mucosa. CSP-F4 exhibited the highest drug release attributed to the micellar properties of P407 that boost the drug solubility. As a consequence of the thermosensitive character of P407, the CSP-F4 formulation may be administered via spray in instances where lesions are highly extensive or placed in inaccessible regions.

The combination of mouth rinses with hydrogels offers a multifaceted approach to treat infection, potentially enhancing the overall effectiveness of the treatment. Furthermore, the synergy between the various ingredients of the formulation may enhance the tolerability of the treatment and promote patients' compliance, enabling them to manage the disease with a single therapy. In summary, different formulations with different features have been developed to address different medical needs of patients suffering from oral candidiasis.

Acknowledgments: The authors would like to thank to AG Sanding (PhD) from animal facility (University of Barcelona) for his valuable help in animal studies, MJM Lopez (PhD) and E Giannone from the University of Barcelona for their excellent technical support, and to Fernando Cobo from Hospital Universitario Virgen de las Nieves for his technical support. Authors would like to extend their gratitude to Juan A. Tamayo for his most valuable contribution to the discussions about chemistry.

Ethics issues: *Ex vivo* studies in porcine buccal and sublingual mucosa were approved by the Animal Experimentation Ethics Committee of the University of Barcelona, Spain (protocol nr. code 10617).

Disclosure statement: The authors report no conflicts of interest. The authors alone are responsible for the content and writing of the paper.

Funding: This research and publication were funded by the Spanish National Research Council (CSIC), project no. 202080E231, and the Agreement with the University of Barcelona and the University of Granada (Official State Gazette 311, on 27th November 2020). Eliana B. Souto was supported by University College Dublin Research Scheme fund 2024–2028 (82934-NP/R27885).

Data availability statement: The data presented in this study are available on request from the corresponding author. The data are not publicly available as they are part of a Doctoral Thesis and it will be available once the thesis is published.

References

- Abdellatif MM, Khalil IA, Elakkad YE, Eliwa HA, Samir TM, Al- Mokaddem AK. 2020. Formulation and characterization of sertaconazole nitrate mucoadhesive liposomes for vaginal candidiasis. *Int J Nanomedicine*. 15:4079–4090. doi: [10.2147/IJN.S250960](https://doi.org/10.2147/IJN.S250960).
- Abu-Jdayil B, Ghannam M, Alsayed Ahmed K, Djama M. 2021. The effect of biopolymer chitosan on the rheology and stability of na-bentonite drilling mud. *Polymers (Basel)*. 13(19):3361. doi: [10.3390/polym13193361](https://doi.org/10.3390/polym13193361).
- Aduba DC, Jr., Hammer JA, Yuan Q, Yeudall WA, Bowlin GL, Yang H. 2013. Semi-interpenetrating network (sIPN) gelatin nanofiber scaffolds for oral mucosal drug delivery. *Acta Biomater*. 9(5): 6576–6584. doi: [10.1016/j.actbio.2013.02.006](https://doi.org/10.1016/j.actbio.2013.02.006).
- Afrasiabifar A, Jafari Dehkordi N, Mosavi A, Nazer Mozaffari MA, Ali Beigi Bani Z. 2020. Oral mucositis: examining the combined solution of grape vinegar and rose water versus chlorhexidine mouthwash. *Clin J Oncol Nurs*. 24(6):E71–e78. doi: [10.1188/20.Cjon.E71-e78](https://doi.org/10.1188/20.Cjon.E71-e78).
- Alvarado HL, Abrego G, Garduño-Ramirez ML, Clares B, Calpena AC, García ML. 2015. Design and optimization of oleanolic/ ursolic acid-loaded nanoplateforms for ocular anti-inflammatory applications. *Nanomedicine*. 11(3):521–530. doi: [10.1016/j.nano.2015.01.004](https://doi.org/10.1016/j.nano.2015.01.004).
- Amores S, Domenech J, Colom H, Calpena AC, Clares B, Gimeno Á, Lauroba J. 2014. An improved cryopreservation method for porcine buccal mucosa in ex vivo drug permeation studies using Franz diffusion cells. *Eur J Pharm Sci*. 60:49–54. doi: [10.1016/j.ejps.2014.04.017](https://doi.org/10.1016/j.ejps.2014.04.017).
- Bakhrushina EO, Anurova MN, Zavalniy MS, Demina NB, Bardakov AI, Krasnyuk II. 2022. Dermatologic gels spreadability measuring methods comparative study. *Int J App Pharm*. 14(1):164–168.
- Baliga S, Muglikar S, Kale R. 2013. Salivary pH: a diagnostic biomarker. *J Indian Soc Periodontol*. 17(4):461–465. doi: [10.4103/0972-124X.118317](https://doi.org/10.4103/0972-124X.118317).
- Bauer AW, Kirby WM, Sherris JC, Turck M. 1966. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am J Clin Pathol*. 45(4_ts):493–496. doi: [10.1093/ajcp/45.4_ts.493](https://doi.org/10.1093/ajcp/45.4_ts.493).
- Berenguer D, Alcover MM, Sessa M, Halbaut L, Guillén C, Boix- Montañés A, Fisa R, Calpena-Campmany AC, Riera C, Sosa L. 2020. Topical amphotericin B semisolid dosage form for cutaneous leishmaniasis: physicochemical characterization, ex vivo skin permeation and biological activity. *Pharmaceutics*. 12(2): 149. doi: [10.3390/pharmaceutics12020149](https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12020149).
- Borsuk-De Moor A, Sysiak-Sławecka J, Rypulak E, Borys M, Piwowarczyk P, Raszewski G, Onichimowski D, Czuczwar M, Wiczling P. 2020. Nonstationary pharmacokinetics of caspofungin in ICU patients. *Antimicrob Agents Chemother*. 64(9): e00345–20. doi: [10.1128/AAC.00345-20](https://doi.org/10.1128/AAC.00345-20).
- Brennan PA, Lewthwaite R, Sakthithasan P, McGuigan S, Donnelly O, Alam P, Gomez RS, Fedele S. 2020. Diclofenac mouthwash as a potential therapy for reducing pain and discomfort in chemo-radiotherapy-induced oral mucositis. *J Oral Pathol Med*. 49(9): 956–959. doi: [10.1111/jop.13001](https://doi.org/10.1111/jop.13001).
- CLSI. 2012. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility test: approved atandard, clinical and laboratory standars institute - NCCLS. Malvern, PA: Clinical & Laboratory Standards Institute.
- de Castro KC, Coco JC, Dos Santos EM, Ataide JA, Martinez RM, do Nascimento MHM, Prata J, da Fonte P, Severino P, Mazzola PG, et al. 2023. Pluronic(R) triblock copolymer-based nanoformulations for cancer therapy: a 10-year overview. *J Control Release*. 353:802–822. doi: [10.1016/j.jconrel.2022.12.017](https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2022.12.017).
- Debone HS, Lopes PS, Severino P, Yoshida CMP, Souto EB, da Silva CF. 2019. Chitosan/Copaiba oleoresin films for wound dressing application. *Int J Pharm*. 555:146–152. doi: [10.1016/j.ijpharm.2018.11.054](https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2018.11.054).

- Dodane V, Amin Khan M, Merwin JR. 1999. Effect of chitosan on epithelial permeability and structure. *Int J Pharm.* 182(1):21–32. doi: [10.1016/S0378-5173\(99\)00030-7](https://doi.org/10.1016/S0378-5173(99)00030-7).
- Drugbank. 2024. DrugBank datasets are released under a Creative Common's Attribution-NonCommercial 4.0 International License. [accessed 2024 March 25]. <https://go.drugbank.com/salts/DBSALT000020>.
- El Moussaoui S, Abo-Horan I, Halbaut L, Alonso C, Coderch L, Garduño-Ramírez ML, Clares B, Soriano JL, Calpena AC, Fernández-Campos F, et al. 2021. Polymeric nanoparticles and chitosan gel loading ketorolac tromethamine to alleviate pain associated with condyloma acuminata during the pre- and post-ablation. *Pharmaceutics*. 13(11):1784. doi: [10.3390/pharmaceutics13111784](https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13111784).
- El Moussaoui S, Fernández-Campos F, Alonso C, Limón D, Halbaut L, Garduño-Ramírez ML, Calpena AC, Mallandrich M. 2021. Topical mucoadhesive alginate-based hydrogel loading ketorolac for pain management after pharmacotherapy, ablation, or surgical removal in condyloma acuminata. *Gels*. 7(1):8. doi: [10.3390/gels7010008](https://doi.org/10.3390/gels7010008).
- Elad S, Cheng KKF, Lalla RV, Yarom N, Hong C, Logan RM, Bowen J, Gibson R, Saunders DP, Zadik Y, et al. 2020. MASCC/ISOO clinical practice guidelines for the management of mucositis secondary to cancer therapy. *Cancer*. 126(19):4423–4431. doi: [10.1002/cnrc.33100](https://doi.org/10.1002/cnrc.33100).
- Elkomy MH, Ali AA, Eid HM. 2022. Chitosan on the surface of nanoparticles for enhanced drug delivery: a comprehensive review. *J Control Release*. 351:923–940. doi: [10.1016/j.jconrel.2022.10.005](https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2022.10.005).
- Espinoza LC, Silva-Abreu M, Clares B, Rodríguez-Lagunas MJ, Halbaut L, Cañas MA, Calpena AC. 2019. Formulation strategies to improve nose-to-brain delivery of donepezil. *Pharmaceutics*. 11(2):64. doi: [10.3390/pharmaceutics11020064](https://doi.org/10.3390/pharmaceutics11020064).
- Espinoza LC, Vera-García R, Silva-Abreu M, Domènech O, Badia J, Rodríguez-Lagunas MJ, Clares B, Calpena AC. 2020. Topical pioglitazone nanoformulation for the treatment of atopic dermatitis: design, characterization and efficacy in hairless mouse model. *Pharmaceutics*. 12(3):255. doi: [10.3390/pharmaceutics12030255](https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12030255).
- Fakhari A, Corcoran M, Schwarz A. 2017. Thermogelling properties of purified poloxamer 407. *Heliyon*. 3(8):e00390. doi: [10.1016/j.heliyon.2017.e00390](https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2017.e00390).
- Firacative C. 2020. Invasive fungal disease in humans: are we aware of the real impact? *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 115: e200430. doi: [10.1590/0074-02760200430](https://doi.org/10.1590/0074-02760200430).
- Fiwek P, Irga-Jaworska N, Wojtylak S, Biernat W, Emerich K, Pomiecko D. 2023. Assessment of cytological changes in the oral mucosa in young hematological patients treated with systemic chemotherapy. *J Clin Med*. 12(7):2665. doi: [10.3390/jcm12072665](https://doi.org/10.3390/jcm12072665).
- Flo A, Calpena AC, Halbaut L, Araya EI, Fernández F, Clares B. 2016. Melatonin delivery: transdermal and transbuccal evaluation in different vehicles. *Pharm Res*. 33(7):1615–1627. doi: [10.1007/s11095-016-1901-9](https://doi.org/10.1007/s11095-016-1901-9).
- Frenkel ES, Ribbeck K. 2015. Salivary mucins in host defense and disease prevention. *J Oral Microbiol*. 7(1):29759. doi: [10.3402/jom.v7.29759](https://doi.org/10.3402/jom.v7.29759).
- Galey WR, Lonsdale HK, Nacht S. 1976. The in vitro permeability of skin and buccal mucosa to selected drugs and tritiated water. *J Invest Dermatol*. 67(6):713–717. doi: [10.1111/1523-1747.ep12598596](https://doi.org/10.1111/1523-1747.ep12598596).
- Galindo-Camacho RM, Haro I, Gómara MJ, Espina M, Fonseca J, Martins-Gomes C, Camins A, Silva AM, García ML, Souto EB. 2023. Cell penetrating peptides-functionalized Licochalcone-A- loaded PLGA nanoparticles for ocular inflammatory diseases: evaluation of in vitro anti-proliferative effects, stabilization by freeze-drying and characterization of an in-situ forming gel. *Int J Pharm*. 639:122982. doi: [10.1016/j.ijpharm.2023.122982](https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2023.122982).
- Galocha-León C, Antich C, Voltes-Martínez A, Marchal JA, Mallandrich M, Halbaut L, Rodríguez-Lagunas MJ, Souto EB, Clares-Naveros B, Gálvez-Martín P. 2023. Development and characterization of a poloxamer hydrogel composed of human mesenchymal stromal cells (hMSCs) for reepithelization of skin injuries. *Int J Pharm*. 647:123535. doi: [10.1016/j.ijpharm.2023.123535](https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2023.123535).
- Gaspar AL, Gaspar AB, Contini LRF, Silva MF, Chagas EGL, Bahou JO, Concha VOC, Carvalho RA, Severino P, Souto EB, et al. 2022. Lemongrass (*Cymbopogon citratus*)-incorporated chitosan bioactive films for potential skincare applications. *Int J Pharm*. 628: 122301. doi: [10.1016/j.ijpharm.2022.122301](https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2022.122301).
- Genesi BP, de Melo Barbosa R, Severino P, Rodas ACD, Yoshida CMP, Mathor MB, Lopes PS, Viseras C, Souto EB, Ferreira da Silva C. 2023. Aloe vera and copaiba oleoresin-loaded chitosan films for wound dressings: microbial permeation, cytotoxicity, and in vivo proof of concept. *Int J Pharm*. 634:122648. doi: [10.1016/j.ijpharm.2023.122648](https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2023.122648).
- Gosecka M, Gosecki M. 2021. Antimicrobial polymer-based hydrogels for the intravaginal therapies-engineering considerations. *Pharmaceutics*. 13(9):1393. doi: [10.3390/pharmaceutics13091393](https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13091393).

- Guo Y-g, Pratap Singh A. 2019. Emerging strategies for enhancing buccal and sublingual administration of nutraceuticals and pharmaceuticals. *Int J Drug Deliv Technol.* 52:440–451. doi: [10.1016/j.jddst.2019.05.014](https://doi.org/10.1016/j.jddst.2019.05.014).
- Hellstein JW, Marek CL. 2019. Candidiasis: red and white manifestations in the oral cavity. *Head Neck Pathol.* 13(1):25–32. doi: [10.1007/s12105-019-01004-6](https://doi.org/10.1007/s12105-019-01004-6).
- Hirata K, Yamada Y, Hamamoto Y, Tsunoda K, Muramatsu H, Horie S, Sukawa Y, Naganuma M, Nakagawa T, Kanai T. 2024. Prospective feasibility study of indigo naturalis ointment for chemotherapy-induced oral mucositis. *BMJ Support Palliat Care.* 13(e3):e1001–e1007. doi: [10.1136/bmjspcare-2021-003199](https://doi.org/10.1136/bmjspcare-2021-003199).
- Hurtado-Sarrión M, Duch-Samper A, Cisneros-Lanuza A, Díaz-Llopis M, Peman-García J, Vazquez-Polo A. 2010. Successful topical application of caspofungin in the treatment of fungal keratitis refractory to voriconazole. *Arch Ophthalmol.* 128(7):941–942. doi: [10.1001/archophthalmol.2010.110](https://doi.org/10.1001/archophthalmol.2010.110).
- Ibáñez-Cortés M, Martín-Piedra M, Blanco-Elices C, García-García ÓD, España-López A, Fernández-Valadés R, Sánchez-Quevedo MDC, Alaminos M, Chato-Astrain J, Garzón I. 2023. Histological characterization of the human masticatory oral mucosa. A histochemical and immunohistochemical study. *Microsc Res Tech.* 86(12):1712–1724. doi: [10.1002/jemt.24398](https://doi.org/10.1002/jemt.24398).
- Ionta FQ, Mendonça FL, de Oliveira GC, de Alencar CR, Honório HM, Magalhães AC, Rios D. 2014. In vitro assessment of artificial saliva formulations on initial enamel erosion remineralization. *J Dent.* 42(2):175–179. doi: [10.1016/j.jdent.2013.11.009](https://doi.org/10.1016/j.jdent.2013.11.009).
- Jalil A, Asim MH, Le N-MN, Laffleur F, Matuszczak B, Tribus M, Bernkop-Schnürch A. 2019. S-protected gellan gum: decisive approach towards mucoadhesive antimicrobial vaginal films. *Int J Biol Macromol.* 130:148–157. doi: [10.1016/j.ijbiomac.2019.02.092](https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.02.092).
- Li WZ, Zhao N, Zhou YQ, Yang LB, Xiao-Ning W, Bao-Hua H, Peng K, Chun-Feng Z. 2012. Post-expansile hydrogel foam aerosol of PG-liposomes: a novel delivery system for vaginal drug delivery applications. *Eur J Pharm Sci.* 47(1):162–169. doi: [10.1016/j.ejps.2012.06.001](https://doi.org/10.1016/j.ejps.2012.06.001).
- López-Machado A, Díaz-Garrido N, Cano A, Espina M, Badia J, Baldomà L, Calpena AC, Souto EB, García ML, Sánchez-López E. 2021. Development of lactoferrin-loaded liposomes for the management of dry eye disease and ocular inflammation. *Pharmaceutics.* 13(10):1698. doi: [10.3390/pharmaceutics13101698](https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13101698).
- Mallandrich M, Fernández-Campos F, Clares B, Halbaut L, Alonso C, Coderch L, Garduño-Ramírez ML, Andrade B, Del Pozo A, Lane ME, et al. 2017. Developing transdermal applications of ketorolac tromethamine entrapped in stimuli sensitive block copolymer hydrogels. *Pharm Res.* 34(8):1728–1740. doi: [10.1007/s11095-017-2181-8](https://doi.org/10.1007/s11095-017-2181-8).
- Márquez Valls M, Martínez Labrador A, Halbaut Bellows L, Bravo Torres D, Granda PC, Miñarro Carmona M, Limón D, Calpena Campmany AC. 2021. Biopharmaceutical study of triamcinolone acetanide semisolid formulations for sublingual and buccal administration. *Pharmaceutics.* 13(7):1080. doi: [10.3390/pharmaceutics13071080](https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13071080).
- Martin L, Wilson CG, Koosha F, Uchegbu IF. 2003. Sustained buccal delivery of the hydrophobic drug denbufylline using physically cross-linked palmitoyl glycol chitosan hydrogels. *Eur J Pharm*
- Martín-Villena MJ, Fernández-Campos F, Calpena-Campmany AC, Bozal-de Febrer N, Ruiz-Martínez MA, Clares-Naveros B. 2013. Novel microparticulate systems for the vaginal delivery of nystatin: development and characterization. *Carbohydr Polym.* 94(1):1–11. doi: [10.1016/j.carbpol.2013.01.005](https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.01.005).
- McCormack PL, Perry CM. 2005. Caspofungin: a review of its use in the treatment of fungal infections. *Drugs.* 65(14):2049–2068. doi: [10.2165/00003495-200565140-00009](https://doi.org/10.2165/00003495-200565140-00009).
- Mei L, Chen J, Yu S, Huang Y, Xie Y, Wang H, Pan X, Wu C. 2017. Expansible thermal gelling foam aerosol for vaginal drug delivery. *Drug Deliv.* 24(1):1325–1337. doi: [10.1080/10717544.2017.1375575](https://doi.org/10.1080/10717544.2017.1375575).
- Mfofo K, Kwon Y, Omidian H. 2022. Contemporary applications of thermogelling PEO-PPO-PEO triblock copolymers. *Int J Drug Deliv Technol.* 70:103182. doi: [10.1016/j.jddst.2022.103182](https://doi.org/10.1016/j.jddst.2022.103182).
- Mohammadi-Meyabadi R, Beirampour N, Garrós N, Alvarado HL, Limón D, Silva-Abreu M, Calpena AC, Mallandrich M. 2022. Assessing the solubility of baricitinib and drug uptake in different tissues using absorption and fluorescence spectroscopies. *Pharmaceutics.* 14(12):2714. doi: [10.3390/pharmaceutics14122714](https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14122714).
- Muzyka BC, Epifanio RN. 2013. Update on oral fungal infections. *Dent Clin North Am.* 57(4):561–581. doi: [10.1016/j.cden.2013.07.002](https://doi.org/10.1016/j.cden.2013.07.002).
- Nagai N, Seiriki R, Deguchi S, Otake H, Hiramatsu N, Sasaki H, Yamamoto N. 2020. Hydrogel formulations incorporating drug nanocrystals enhance the therapeutic effect of rebamipide in a hamster model for oral mucositis. *Pharmaceutics.* 12(6):532. doi: [10.3390/pharmaceutics12060532](https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12060532).

- Naniwa M, Nakatomi C, Hitomi S, Matsuda K, Tabuchi T, Sugiyama D, Kubo S, Miyamura Y, Yoshino K, Akifusa S, et al. **2021**. Analgesic mechanisms of steroid ointment against oral ulcerative mucositis in a rat model. *Int J Mol Sci*. 22(22):12600. doi: [10.3390/ijms22212600](https://doi.org/10.3390/ijms22212600).
- Neoh CF, Leung L, Misra A, Vajpayee RB, Davies GE, Fullinlaw RO, Stewart K, Kong DC. **2011**. Penetration of topically administered 0.5-percent caspofungin eye drops into human aqueous humor. *Antimicrob Agents Chemother*. 55(4):1761–1763. doi: [10.1128/AAC.01175-10](https://doi.org/10.1128/AAC.01175-10).
- NIH. **2017**. United States Department of Health and Human Services. National Institutes of Health. National Cancer Institute. Common terminology criteria for adverse events version 5.0, Washington DC. https://ctepcancer.gov/protocoldevelopment/electronic_applications/docs/CTCAE_v5_Quick_Reference_5x7pdf.
- Nishii M, Soutome S, Kawakita A, Yutori H, Iwata E, Akashi M, Hasegawa T, Kojima Y, Funahara M, Umeda M, et al. **2020**. Factors associated with severe oral mucositis and candidiasis in patients undergoing radiotherapy for oral and oropharyngeal carcinomas: a retrospective multicenter study of 326 patients. *Support Care Cancer*. 28(3):1069–1075. doi: [10.1007/s00520-019-04885-z](https://doi.org/10.1007/s00520-019-04885-z).
- Odds FC, Motyl M, Andrade R, Bille J, Cantón E, Cuenca-Estrella M, Davidson A, Durussel C, Ellis D, Foraker E, et al. **2004**. Interlaboratory comparison of results of susceptibility testing with caspofungin against *Candida* and *Aspergillus* species. *J Clin Microbiol*. 42(8):3475–3482. doi: [10.1128/JCM.42.8.3475-3482.2004](https://doi.org/10.1128/JCM.42.8.3475-3482.2004).
- Odds FC. **1988**. *Candida and candidosis: a review and bibliography*. London: Bailliere Tindall; p. 88–89.
- Patel VF, Liu F, Brown MB. **2011**. Advances in oral transmucosal drug delivery. *J Control Release*. 153(2):106–116. doi: [10.1016/j.jconrel.2011.01.027](https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2011.01.027).
- Pérez-González N, Bozal-de Febrer N, Calpena-Campmany AC, Nardi-Ricart A, Rodríguez-Lagunas MJ, Morales-Molina JA, Soriano-Ruiz JL, Fernández-Campos F, Clares-Naveros B. **2021**. New formulations loading caspofungin for topical therapy of vulvovaginal candidiasis. *Gels*. 7(4):259. doi: [10.3390/gels7040259](https://doi.org/10.3390/gels7040259).
- Pérez-González N, Espinoza LC, Rincón M, Sosa L, Mallandrich M, Suñer-Carbo J, Bozal-de Febrer N, Calpena AC, Clares-Naveros B. **2023**. Gel formulations with an echinocandin for cutaneous candidiasis: the influence of azone and transcutol on biopharmaceutical features. *Gels*. 9(4):308. doi: [10.3390/gels9040308](https://doi.org/10.3390/gels9040308).
- Preetha A, Banerjee R. **2005**. Comparison of artificial saliva substitutes. *Trends Biomater Artif Organs*. 18:178.
- Pulito C, Cristaudo A, Porta C, Zapperi S, Blandino G, Morrone A, Strano S. **2020**. Oral mucositis: the hidden side of cancer therapy. *J Exp Clin Cancer Res*. 39(1):210. doi: [10.1186/s13046-020-01715-7](https://doi.org/10.1186/s13046-020-01715-7).
- Ramos-Pardo A, Castro-Álvarez R, Quindós G, Eraso E, Sevillano E, Kaberdin VR. **2023**. Assessing pH-dependent activities of virulence factors secreted by *Candida albicans*. *Microbiologyopen*. 12(1):e1342. doi: [10.1002/mbo3.1342](https://doi.org/10.1002/mbo3.1342).
- Rossi S, Bonferoni MC, D'Autilia F, Sandri G, Ferrari F, Caramella C, Mortara E, Giannini V, Gasparri F. **2014**. Associations of natural polymers to modulate mucoadhesion of vaginal rinse-off and leave-on formulations. *Int J Drug Deliv Technol*. 24(5):496–502. doi: [10.1016/S1773-2247\(14\)50094-9](https://doi.org/10.1016/S1773-2247(14)50094-9).
- Ruiz-Camps I, Cuenca-Estrella M. **2009**. [Antifungals for systemic use]. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 27(6):353–362. doi: [10.1016/j.eimc.2009.04.001](https://doi.org/10.1016/j.eimc.2009.04.001).
- Rupe C, Gioco G, Almadori G, Galli J, Micciché F, Olivieri M, Cordaro M, Lajolo C. **2022**. Oral *Candida* spp. colonisation is a risk factor for severe oral mucositis in patients undergoing radiotherapy for head & neck cancer: results from a multidisciplinary mono-institutional prospective observational study. *Cancers (Basel)*. 14(19):4746. doi: [10.3390/cancers14194746](https://doi.org/10.3390/cancers14194746).
- Sahariah P, Másson M. **2017**. Antimicrobial chitosan and chitosan derivatives: a review of the structure–activity relationship. *Biomacromolecules*. 18(11):3846–3868. doi: [10.1021/acs.biomac.7b01058](https://doi.org/10.1021/acs.biomac.7b01058).
- Saikia C, Gogoi P, Maji T. **2015**. Chitosan: A promising biopolymer in drug delivery applications. *J Mol Genet Genomic Med*. 4(006):899–910.
- Sanz R, Clares B, Mallandrich M, Suñer-Carbo J, Montes MJ, Calpena AC. **2018**. Development of a mucoadhesive delivery system for control release of doxepin with application in vaginal pain relief associated with gynecological surgery. *Int J Pharm*. 535(1-2):393–401. doi: [10.1016/j.ijpharm.2017.11.027](https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2017.11.027).
- Seyedmousavi S, Rafati H, Ilkit M, Tolooe A, Hedayati MT, Verweij P. **2017**. Systemic antifungal agents: current status and projected future developments. *Methods Mol Biol*. 1508:107–139. doi: [10.1007/978-1-4939-6515-1_5](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6515-1_5).

- Shaarani S, Hamid SS, Mohd Kaus NH. 2017. The influence of pluronic F68 and F127 nanocarrier on physicochemical properties, in vitro release, and antiproliferative activity of thymoquinone drug. *Pharmacognosy Res.* 9(1):12–20. doi: [10.4103/0974-8490.199774](https://doi.org/10.4103/0974-8490.199774).
- Shao W, Chen R, Lin G, Ran K, Zhang Y, Yang J, Pan H, Shangguan J, Zhao Y, Xu H. 2021. In situ mucoadhesive hydrogel capturing tripeptide KPV: the anti-inflammatory, antibacterial and repairing effect on chemotherapy-induced oral mucositis. *Biomater Sci.* 10(1):227–242. doi: [10.1039/D1BM01466H](https://doi.org/10.1039/D1BM01466H).
- Sheehan DJ, Brown SD, Pfaller MA, Warnock DW, Rex FJH, Chaturvedi FV, Espinel-Ingroff A, Ghannoum MA, Moore LS, Odds FC, et al. 2004. Method for antifungal disk diffusion susceptibility testing of yeasts; approved guideline. NCCLS Document MA44-A. Malvern, PA: N. Clinical & Laboratory Standards Institute.
- Sonis ST. 2004. The pathobiology of mucositis. *Nat Rev Cancer.* 4(4):277–284. doi: [10.1038/nrc1318](https://doi.org/10.1038/nrc1318).
- Sonis ST. 2009. Mucositis: the impact, biology and therapeutic opportunities of oral mucositis. *Oral Oncol.* 45(12):1015–1020. doi: [10.1016/j.oraloncology.2009.08.006](https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2009.08.006).
- Soriano JL, Calpena AC, Rincón M, Pérez N, Halbaut L, Rodríguez- Lagunas MJ, Clares B. 2020. Melatonin nanogel promotes skin healing response in burn wounds of rats. *Nanomedicine (Lond).* 15(22):2133–2147. doi: [10.2217/nnm-2020-0193](https://doi.org/10.2217/nnm-2020-0193).
- Soriano-Ruiz JL, Calpena-Campmany AC, Silva-Abreu M, Halbout- Bellowa L, Bozal-de Febrer N, Rodríguez-Lagunas MJ, Clares- Naveros B. 2020. Design and evaluation of a multifunctional thermosensitive poloxamer-chitosan-hyaluronic acid gel for the treatment of skin burns. *Int J Biol Macromol.* 142:412–422. doi: [10.1016/j.ijbiomac.2019.09.113](https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.09.113).
- Takeuchi H, Thongborisute J, Matsui Y, Sugihara H, Yamamoto H, Kawashima Y. 2005. Novel mucoadhesion tests for polymers and polymer-coated particles to design optimal mucoadhesive drug delivery systems. *Adv Drug Deliv Rev.* 57(11):1583–1594. doi: [10.1016/j.addr.2005.07.008](https://doi.org/10.1016/j.addr.2005.07.008).
- Tas C, Ozkan Y, Okyar A, Savaser A. 2007. In vitro and ex vivo permeation studies of etodolac from hydrophilic gels and effect of terpenes as enhancers. *Drug Deliv.* 14(7):453–459. doi: [10.1080/10717540701603746](https://doi.org/10.1080/10717540701603746).
- Vasile C, Pamfil D, Stoleru E, Baican M. 2020. New developments in medical applications of hybrid hydrogels containing natural polymers. *Molecules.* 25(7):1539. doi: [10.3390/molecules25071539](https://doi.org/10.3390/molecules25071539).
- Wang W, Meng Q, Li Q, Liu J, Zhou M, Jin Z, Zhao K. 2020. Chitosan derivatives and their application in biomedicine. *Int J Mol Sci.* 21(2):487. doi: [10.3390/ijms21020487](https://doi.org/10.3390/ijms21020487).
- Yang TT, Cheng YZ, Qin M, Wang YH, Yu HL, Wang AL, Zhang WF. 2017. Thermosensitive chitosan hydrogels containing polymeric microspheres for vaginal drug delivery. *Biomed Res Int.* 2017:3564060–3564012. doi: [10.1155/2017/3564060](https://doi.org/10.1155/2017/3564060).
- Yener G, Dal O, Uner M. 2009. Effect of vehicles on release of meloxicam from various topical formulations. *TODDJ.* 3(1):19– 23. doi: [10.2174/1874126600903010019](https://doi.org/10.2174/1874126600903010019).
- Zhou Y, Cheng L, Lei YL, Ren B, Zhou X. 2021. The interactions between candida albicans and mucosal immunity. *Front Microbiol.* 12:652725. doi: [10.3389/fmicb.2021.652725](https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.652725).

Disclaimer/Publisher’s Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

Artículo 3

New Formulations Loading Caspofungin for Topical Therapy of Vulvovaginal Candidiasis

«Nuevas formulaciones que cargan caspofungina para el tratamiento tópico de la candidiasis vulvovaginal»

Noelia Pérez-González, Nuria Bozal-de Febrer, Ana C. Calpena-Campmany, Anna Nardi-Ricart, María J. Rodríguez-Lagunas, José A. Morales-Molina, José L. Soriano-Ruiz, Francisco Fernández-Campos and Beatriz Clares-Naveros

Gels

2021, 7(4), 259

<https://doi.org/10.3390/gels7040259>

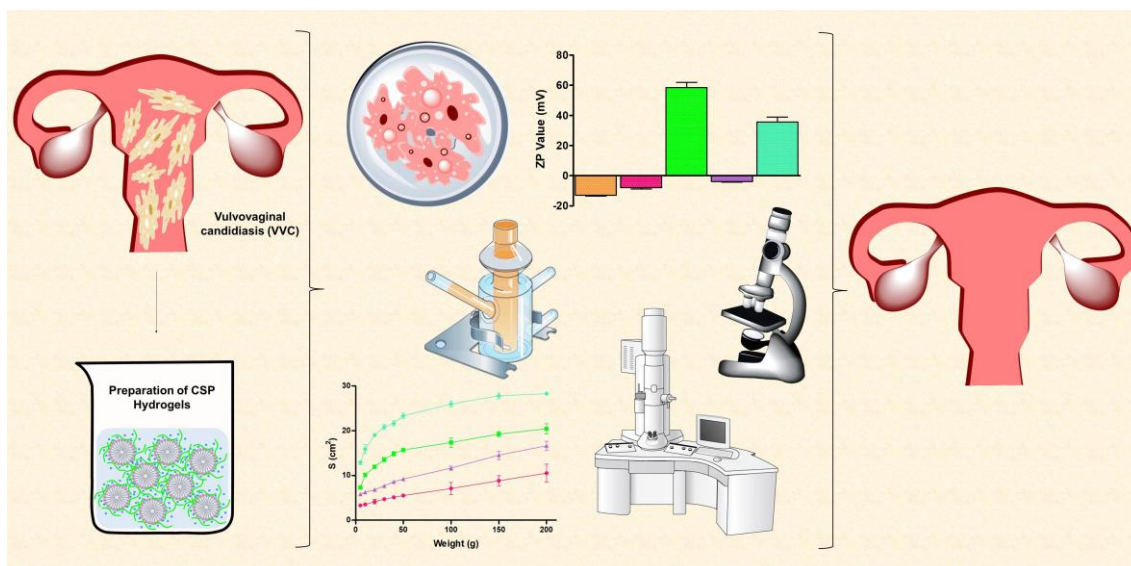
eISSN	2310-2861
Editorial	MDPI (Multidisciplinary Digital Publishing Institute)
Factor de impacto	5,0
Categoría	Polymer Science
Special Issue	Advanced Hydrogels for Biomedical Applications
Posición	15/95
Cuartil	Q1

Resumen

La candidiasis vulvovaginal (CVV) representa un problema significativo a nivel mundial, afectando a mujeres de todas las edades y condiciones sociales. Se manifiesta mediante cambios en el flujo vaginal, irritación, picazón y sensación de escozor. Aunque la mayoría de las pacientes responden al tratamiento tópico, sigue existiendo la necesidad de ampliar el arsenal terapéutico debido a la creciente resistencia a los agentes antiinfecciosos. Este estudio se diseñó para desarrollar y caracterizar tres hidrogeles formulados con quitosano (CTS), Poloxámero 407 (P407) y una combinación de ambos, conteniendo 2 % de caspofungina (CSP) para el tratamiento vaginal de la CVV. El CTS se seleccionó por sus propiedades mucoadhesivas, mientras que el P407 se empleó para aprovechar sus posibles ventajas relacionadas con el aumento de la concentración del fármaco y lograr un efecto local.

Las formulaciones fueron caracterizadas física, mecánica y morfológicamente. Se realizaron estudios del perfil de liberación del fármaco y permeación vaginal *ex vivo*. Además, se evaluó la eficacia antifúngica frente a diferentes cepas de *Candida* spp. y se analizó la tolerancia mediante estudios histológicos. Los resultados confirmaron que los hidrogeles de CSP podrían considerarse candidatos prometedores para el tratamiento de la CVV.

Graphical abstract



New Formulations Loading Caspofungin for Topical Therapy of Vulvovaginal Candidiasis

Noelia Pérez-González¹, Nuria Bozal-de Febrer², Ana C. Calpena-Campmany^{3,4}, Anna Nardi-Ricart¹, María J. Rodríguez-Lagunas^{5,6}, José A. Morales-Molina⁷, José L. Soriano-Ruiz¹, Francis Fernandez-Campos^{8,*} and Beatriz Clares-Naveros^{1,4,9}

¹ Department of Pharmacy and Pharmaceutical Technology, Faculty of Pharmacy, Campus of Cartuja, University of Granada, 18071 Granada, Spain; noeliaperez93@correo.ugr.es (N.P.-G.); annanardi@ub.edu (A.N.-R.); jlsoriano@correo.ugr.es (J.L.S.-R.); beatrizclares@ugr.es (B.C.-N.)

² Department of Biology, Healthcare and the Environment, Faculty of Pharmacy and Food Sciences, University of Barcelona, 27-31 Joan XXIII Ave., 08028 Barcelona, Spain; nuriaboaldefebrer@ub.

³ Department of Pharmacy and Pharmaceutical Technology and Physical Chemistry, Faculty of Pharmacy and Food Sciences, University of Barcelona, 27-31 Joan XXIII Ave., 08028 Barcelona, Spain; anacalpena@ub.edu

⁴ Institute of Nanoscience and Nanotechnology (IN2UB), University of Barcelona, 08028 Barcelona, Spain

⁵ Department of Biochemistry and Physiology, Faculty of Pharmacy and Food Sciences, University of Barcelona, 08028 Barcelona, Spain; mjrodriguez@ub.edu

⁶ Institute of Biomedicine, University of Barcelona, 08028 Barcelona, Spain

⁷ Department of Pharmacy, Torrecárdenas University Hospital, s/n Hermandad de Donantes de Sangre St., 04009 Almeria, Spain; joseantonio.morales@ephpo.es

⁸ Reig-Jofre Laboratories, Av. de les Flors s/n, 08970 Sant Joan Despi, Spain

⁹ Biosanitary Institute of Granada (ibs.GRANADA), 18012 Granada, Spain

* Correspondence: ffernandez@reigjofre.com

Abstract

Vulvovaginal candidiasis (VVC) poses a significant problem worldwide affecting women from all strata of society. It is manifested as changes in vaginal discharge, irritation, itching and stinging sensation. Although most patients respond to topical treatment, there is still a need for increase the therapeutic arsenal due to resistances to anti-infective agents. The present study was designed to develop and characterize three hydrogels of chitosan (CTS), Poloxamer 407 (P407) and a combination of both containing 2% caspofungin (CSP) for the vaginal treatment of VVC. CTS was used by its mucoadhesive properties and P407 was used to exploit potential advantages related to increasing drug concentration in order to provide a local effect. The formulations were physically, mechanically and morphologically characterized. Drug release profile and *ex vivo* vaginal permeation studies were performed. Antifungal efficacy against different strains of *Candida* spp. was also evaluated. In addition, tolerance of formulations was studied by histological analysis. Results confirmed that CSP hydrogels could be proposed as promising candidates for the treatment of VVC.

Keywords: vulvovaginal candidiasis; antifungal therapy; caspofungin; vaginal mucosal delivery; mucoadhesive hydrogel; thermoreversible hydrogel

1. Introduction

Vulvovaginal candidiasis (VVC) is a health problem that affects approximately 70–75% of women worldwide at least once during their lifetime [1,2]. It has been estimated that about 50% of women will suffer VVC again and 8% will develop chronic VVC [3]. The symptoms include changes in vaginal discharge, irritation and itching sensation, stinging, burning sensation inside and/or outside the vagina, pain during urination and discomfort during sexual intercourse. Other symptoms include scratching lesions, swelling and vulvar redness [4]. Candidiasis is commonly caused by *Candida* spp. The predominant species are *C. albicans*, followed by *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. krusei* and *C. parapsilosis* [5]. VVC is estimated to be the second most common cause of vaginitis after bacterial vaginosis. *C. albicans* accounts for 85–90% of cases [6].

On the other hand, infections of the genitourinary system are the second reason for consultation during and after the severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) pandemic. Without epidemiological studies to confirm this, a considerable portion of health care has been motivated by vulvovaginal symptoms compatible with vulvovaginitis due to *Candida* spp. Changes in habits, stress, the use of broad-spectrum antibiotics or dexamethasone [7], prolonged stays in the intensive care units, or catheters may be important factors that cause patients with COVID-19 to develop these vaginal infections through the alteration of the microbiological balance of the area [8]. In addition, COVID-19 disease, caused by SARS-CoV-2, may increase systemic fungal co-infections associated with COVID-19. Patients with COVID-19, especially those who are affected severely or immunocompromised are more susceptible to develop invasive mycoses [9].

Although most patients with VVC respond to topical treatment, mortality rates associated with invasive fungal infections are really high, and there is a growing concern about resistance to anti-infective agents [10,11]. Fortunately, the arsenal of antifungal agents is continuously improved and a new antifungal drug family is being developed: echinocandins [12–14]. Among this family caspofungin (CSP) is a semi-synthetic water soluble lipopeptide obtained from *Glarea lozoyensis* as a fermentation product. The mechanism of action consists of blocking the synthesis of an essential component of the cell wall of numerous fungal species, β (1,3)-D-glucan. CSP is presented as a lyophilized powder in its acetate form. This drug is only available for hospital use and it is administered intravenously [15–18].

It is of outmost importance for drug administration through vaginal area to take into account the anatomy of this especial cavity as well as its secretions, as the resulting fluids can alter both the retention of the formulation and the release of the drug [19]. To overcome these problems, formulations aimed to provide spatial and temporal control of drug delivery have been designed by providing coverage of the affected areas without elimination, as well as being compatible with aqueous environments. These formulations are hydrogels [20]. Different hydrogels as drug delivery system against VVC have been used focusing on the effective therapeutic response at the vaginal mucosa. A review of the literature shows that most of these formulations are hydrogels loaded with classical antifungal drugs such as amphotericin B, miconazole or clotrimazole [21–25]. However, other authors have opted to incorporate into their formulations alkannin, diphenyl diselenide, anise or terbinafine, among others [26–29]. There are not previous studies reporting the delivery of CSP because is the first time it has been applied topically in vaginal mucosa. Only a topical study of eye drops has been found in the literature [30].

It is well-known that hydrogels are three-dimensional polymeric networks containing large amounts of water in their structure [31]. Water-soluble polymers have the ability to adhere to mucosal tissues. These mucoadhesive properties are related to those charged polymers with a higher molecular weight, which possess greater ability to adhere to tissues [32]. Chitosan (CTS) is a cationic polysaccharide that exhibits antimicrobial activity. It is also characterized by

mucoadhesive properties [33–35]. CTS has been chosen in this work because of its biocompatibility, biodegradability, ability to form gels *in situ* with negatively charged macromolecules and for its mucoadhesive, antimicrobial and antifungal properties. The cationic nature of CTS confers a sol-gel transition at pH 6.5, when the medium changes from acidic to neutral [36,37]. In its context, poloxamer 407 (P407) is a hydrophilic non-ionic surfactant belonging to the poloxamers copolymers family, which are known for being thermoreversible [38]. Both CTS and P407 have been widely used as delivery systems for the release of different drugs for vaginal administration [39–43].

In recent years, polymer combination designs have been developed to give them multifunctionality. Natural polymers, such as CTS, ensure minimally invasive gels in the human body, while synthetic polymers, such as P407, produce gels with high mechanical resistance. The advantage of joining both polymers would let us to obtain a hydrogel with optimal biocompatible and biodegradable nature, high-water content, high responsiveness and permeability, and then obtain an improved therapeutic effect [44]. Both polymers are linked by non-covalent interactions between the amino groups of CTS and the ethylene oxide units of P407 to form a high-strength physical [45]. The combination of these polymers has also been used for drug delivery, including vaginal administration [46–49].

Thus, the main objective of this study is the development of a topical delivery system for the vehiculization of CSP. The vaginal topical use of CSP has never been reported. For this general purpose, three formulations in form of hydrogels of CTS, P407 and the combination of both have been investigated for the treatment of VVC. The specific goals of this research are: (i) the detailed physicochemical characterization of CSP hydrogels for topical application, (ii) the *in vitro* release and *ex vivo* permeation studies through vaginal tissues, (iii) the *in vitro* studies of antifungal activity and, (iv) the histological evaluation of the effect of these formulations.

2. Results and Discussion

2.1. Physical Characterization of Caspofungin Hydrogels

2.1.1. pH Evaluation

The pH values for CSP-CTS, CSP-P407 and CSP-CTS/P407 hydrogels were 4.58 ± 0.05 , 6.27 ± 0.03 and 4.24 ± 0.05 , respectively. None of these values changed after three month- storage period at $4 \pm 1.00^\circ\text{C}$. When the formulations were mixed with simulated vaginal fluid (SVF), the pH of CSP-CTS and CSP-CTS/P407 remained unaltered, while the pH of CSP-P407 decreased to 4.58 ± 0.10 .

Although the pH of the vagina is around 4.5, it can be affected when an infection occurs, then it could reach up to 7 [10,50]. In the present study, the pH of the formulations was found to be within the vaginal pH conditions.

2.1.2. Morphological Studies

In order to characterize the microstructural architecture of samples a Scanning Electron Microscopy (SEM) analysis was performed. Figure 1A shows a uniform network sheet of CSP-CTS hydrogel without pores or cracks in its fibrous structure. As a result, a homogeneous and well-controlled final morphology has been obtained. The figure corresponding with the sample CSP-P407 hydrogel (Figure 1B) illustrates a highly porous structure typical of P407. Figure 1C shows a highly porous network with more distinct pores than CSP-P407 network, resulting in better interconnection between CTS and P407 [51]. Probably, for CSP- P407 hydrogel micelles contacted mutually similarly to the increase in viscosity. Instead for the CSP-CTS/P407 hydrogel chitosan is sandwiched between micelles [52].

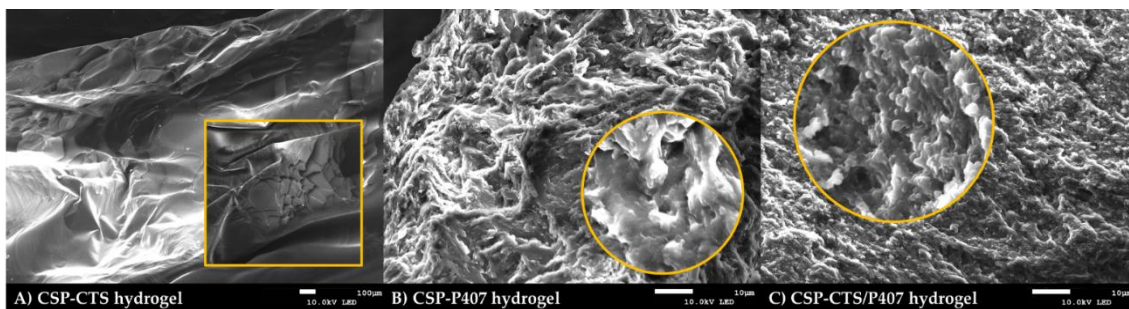


Figure 1. Scanning Electron Microscope micrographs images obtained for: (A) CSP-CTS hydrogel at x50 (magnification x850); (B) CSP-P407 hydrogel at x1200 (magnification x4300); and (C) CSP-CTS/P407 hydrogel at x1200 (magnification x4500).

Finally, the SEM image confirms that the drug has been correctly incorporated into the hydrogels because no drug crystals were observed adhering to the surface.

2.1.3. Surface Electrical Properties

The surface charge of the formulation is a parameter that informs about its stability, clearance, as well as its solubility and drug distribution [53]. As shown in Table 1, the zeta potential (ZP) values were 80.36 ± 4.72 , 11.14 ± 1.62 and 49.76 ± 3.22 mV for CTS, P407 and CTS/P407 hydrogels, respectively. Values for CSP loaded hydrogels were 74.00 ± 4.19 , 9.94 ± 0.74 and 40.51 ± 3.87 mV for CSP-CTS, CSP-P407 and CSP-CTS/P407 hydrogels, respectively. No significant changes ($p < 0.05$) in ZP values were observed when CSP was incorporated into the formulations, indicating that it was uniformly distributed in the system without precipitation.

Table 1. Zeta potential data of unloaded and loaded formulations. Zeta potential data represent the mean $\pm$ SD of nine replicates.

	Zeta potential values (mV)	
	CSP-loaded	CSP-unloaded
CTS hydrogel	80.36 ± 4.72	74.00 ± 4.19
P407 hydrogel	11.14 ± 1.62	9.94 ± 0.74
CTS/P407 hydrogel	49.76 ± 3.22	40.51 ± 3.87

2.1.4. Rheological Behavior

The rheological characteristics of formulations play an important role in physical stability, sensorial characteristics, spreadness and dosing behavior. All these properties are related with the application characteristics and are crucial attributes for the development of topical drug products [54–56]. Sample readings were taken at 4, 25 and 37°C in order to reproduce the behavior after storage in the refrigerator or at room temperature, and after application in the vaginal cavity.

Under rotational testing, CSP-CTS and CTS/P407 hydrogels presented a non-newtonian behavior (Table 2), adjusting to a shear thinning (pseudoplastic) profile, being the Cross equation the model that best fitted experimental data. Moreover, the flow curves showed an apparent thixotropic behavior in both systems as the rheograms displayed a hysteresis loop. These rheological characteristics are desirable for topical application, allowing the formation of a stable and consistent film covering the application area that allows the diffusion of the drug through the matrix [54,57,58]. This can also be an interesting feature because it improves syringeability properties and thus facilitate vaginal administration with the cannula.

The results of Table 2 also reveal that CSP-CTS hydrogel presented at 50 s^{-1} higher viscosity values than CSP-CTS/P407 hydrogel, $2237 \pm 13.40 \text{ mPa}\cdot\text{s}$ and $1868 \pm 14.11 \text{ mPa}\cdot\text{s}$ at 4°C,

respectively. For both formulations, the increase of temperature involved similar decrease in the viscosity under rotational testing conditions. However, the CSP-P407 hydrogel corresponds to a typical poloxamer-based thermoreversible gel which has the characteristic of being liquid and syringeable at low temperatures and gel at the body temperature [59]. Therefore, the CSP-P407 hydrogel viscosity increased from 16.45 ± 0.60 mPa·s (SOL structure at 4°C) to 70.73 ± 2.02 mPa·s (GEL structure at 37°C). These viscosity values were much lower than those obtained for gels CSP-CTS hydrogel and CSP-CTS/P407 hydrogel, both with the same quantity of CTS. In parallel, the CSP-P407 hydrogel flow curve presented a nearly newtonian behavior at 4°C and a shear thinning character at 37°C, according to the change of the structure of the system.

Although the rotational testing did not detect the thermogelling phenomenon of the poloxamer included in the combination of CSP-CTS/P407 system, the temperature sweep under oscillatory testing did give evidence of this process. The results of the temperature sweep test performed to investigate the in-situ poloxamer gelling in the case of CSP-P407 hydrogel and CSP-CTS/P407 hydrogel are depicted in Figure 2. According to the CSP-P407 hydrogel graph (Figure 2A), the TSOL-GEL (where $G' = G''$) was about 25°C. This is the temperature at which the sample exhibits a switch from a prevalently viscous behavior ($G'' > G'$) to a prevalently elastic one ($G' > G''$). This interesting gelation process results in an increase in the residence time avoiding the rapid gel elimination [59].

Table 2. Results of the rheological rotational testing of the formulations CSP-CTS, CSP-P407 and CSP-CTS/P407 hydrogels.

Samples	Temperature (°C)	Rheological Behaviour and Model		Viscosity at 50 s ⁻¹ (mPa·s)	Apparent Thixotropy
		Stretch Ramp-Up	Stretch Ramp-Down		
CSP-CTS hydrogel	4	Pseudoplastic (Cross, r = 0.9998)	Pseudoplastic (Cross, r = 1)	2237 ± 13.40	Presence
	25	Pseudoplastic (Cross, r = 0.9999)	Pseudoplastic (Cross, r = 1)	1645 ± 11.87	Presence
	37	Pseudoplastic (Cross, r = 0.9999)	Pseudoplastic (Cross, r = 1)	1291 ± 7.08	Presence
CSP-P407 hydrogel	4	Pseudoplastic (Cross, r = 0.9997)	Newtonian (Newton, r = 0.9999)	16.45 ± 0.60	Absence
	25	Irregular flow	Irregular flow	73.94 ± 6.09	Presence
	37	Pseudoplastic (Cross, r = 0.9989)	Pseudoplastic (Cross, r = 0.9974)	70.73 ± 2.02	Presence
CSP-CTS/P407 hydrogel	4	Pseudoplastic (Cross, r = 0.9997)	Pseudoplastic (Cross, r = 1)	1868 ± 14.11	Presence
	25	Pseudoplastic (Cross, r = 0.9998)	Pseudoplastic (Cross, r = 1)	1425 ± 12.88	Presence
	37	Pseudoplastic (Cross, r = 0.9997)	Pseudoplastic (Cross, r = 1)	1009 ± 5.51	Presence

Regarding the CSP-CTS/P407 hydrogel graph (Figure 2B), the crossover corresponding to the T_{SOL-GEL} took place earlier, at 19.5°C and compared to the CSP-P407 hydrogel graph, at low temperatures the values of both G' and G'' moduli were much higher. It has been indicated that using a 20% (w/v) solution of poloxamer, with the addition of chitosan (1.5% w/v) a syringeable, thermosensitive and mucoadhesive gel could be obtained [60]. However, in the case of CSP-CTS/P407 hydrogel, the addition of CTS modifies the properties of the system. CTS interacts with P407 through its polyethylene oxide chains, increasing the number of hydrophilic chains and therefore the thickness of the micellar crown. Due to this interaction, the apparent viscosity could increase and the temperature T_{SOL-GEL} could decrease [52,61].

2.1.5. Spreadability Test

Spreadability properties of samples are important parameters to evaluate in topical forms because can influence both the packaging process and the uniformity of dose and application, and therefore the therapeutic efficacy [57,62]. The data obtained in the test are presented in Figure 3. It can be easily observed that the developed hydrogels exhibit higher extensibility values than the reference sample. CSP-CTS/P407 hydrogel possess the highest area, 28.27 cm², followed by CSP-CTS and P407-CPS hydrogels, with areas of 20.44 and 16.63 cm², respectively. The reference sample showed an area of 10.51 cm².

In terms of application, CSP-CTS/P407 hydrogel facilitates application on the vaginal mucosal, an anatomical area where application is especially difficult.

Promisingly, CSP-CTS/P407 hydrogel can be a potential formulation for the treatment of vaginal infection. Due to its thermo-sensitive properties, the hydrogel in the SOL state penetrate to the infection sites in deep vaginal rugae, in contrast in GEL state will provide improved mucosal adhesion and prolonged drug retention (Figure 4).

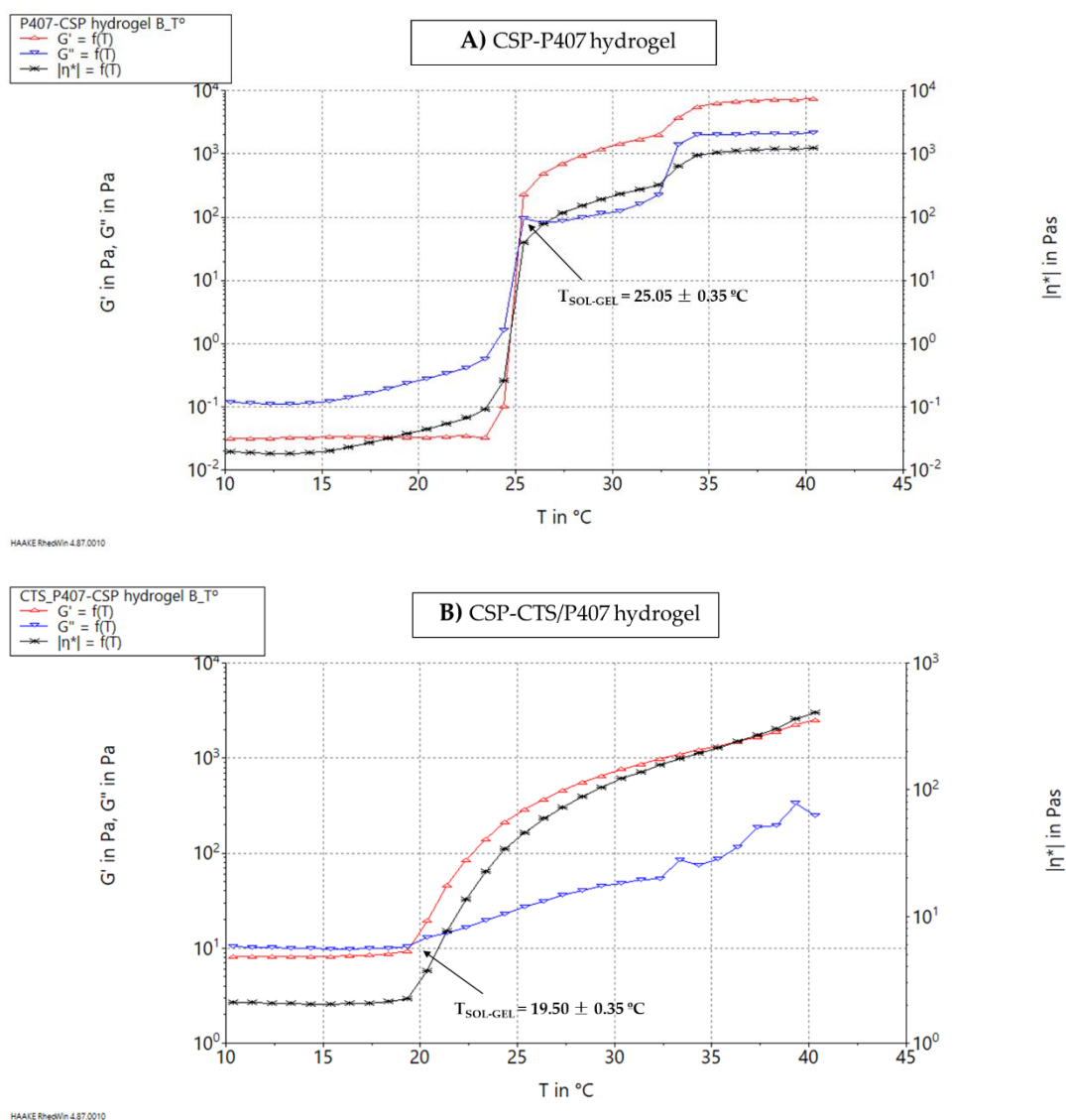


Figure 2. SOL-GEL Temperature Transition: (A) CSP-P407 hydrogel; and (B) CSP-CTS/P407 hydrogel.

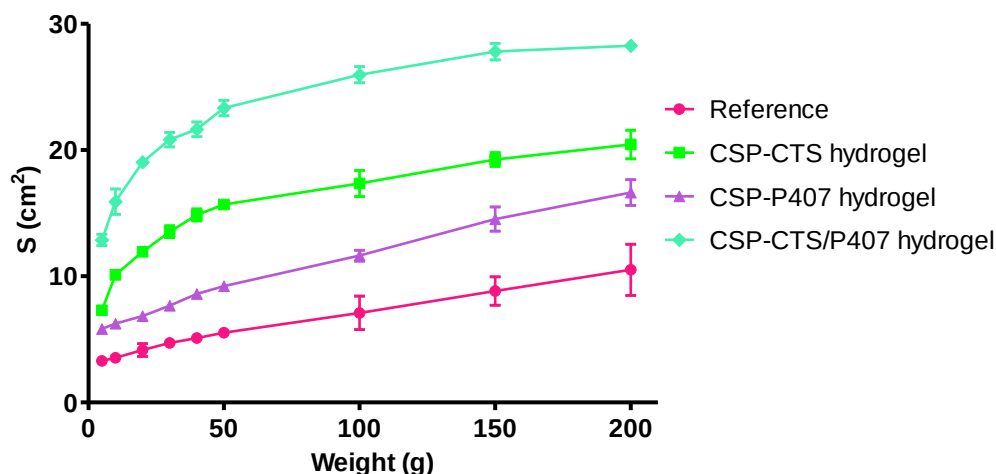


Figure 3. Spreading area (S , cm^2) as a function of the applied mass (g) at 37°C of reference and CSP-CTS, CSP-P407 and CSP-CTS/P407 hydrogels. Each value represents the mean $\pm$ SD ($n = 3$).

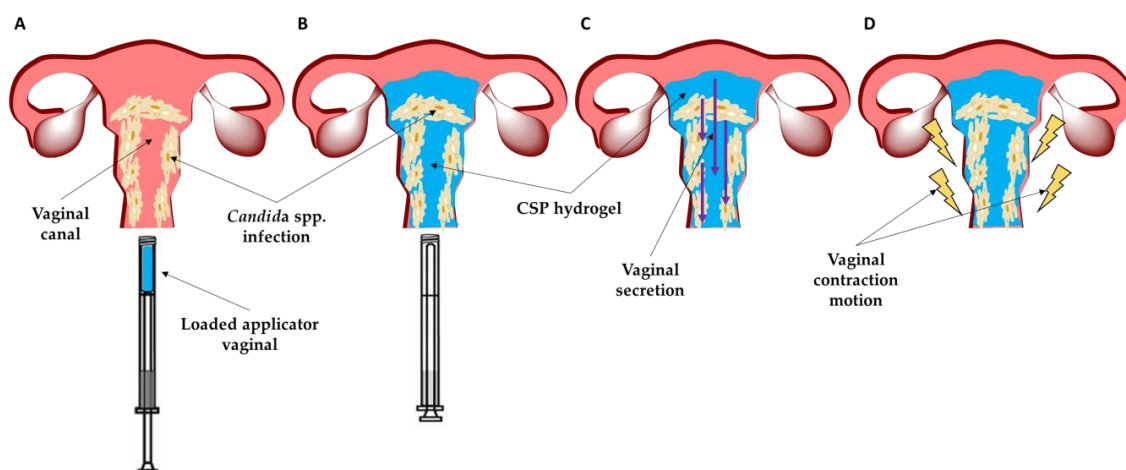


Figure 4. Schematic illustration of the mechanism of hydrogel application: (A) Administration into the vaginal cavity of the formulation through an applicator; (B) Expansion of the hydrogel through the vaginal cavity covering the infection focus; (C) Resistance of the hydrogel to vaginal secretion; and (D) Resistance of the hydrogel to vaginal contraction movement.

2.1.6. Extrudability Study

The results of extrudability can be observed in Table 3. It should be taken into consideration that vaginal applicators are hollow tubes whose lumen is much bigger than that of a syringe. Therefore, it would be convenient for the formulation to be expelled by exerting the minimal force as possible [57].

Table 3. Extrudability (g/cm^2) behavior at 4°C of reference and CSP hydrogel. Each value represents the mean $\pm$ SD ($n = 3$).

	Extrudability (g/cm^2)
Reference	$8.05 \pm 0.29^*$
CSP-CTS hydrogel	$4.52 \pm 0.43^*$
CSP-P407 hydrogel	$0.07 \pm 0.01^*$
CTS/P407 hydrogel	$1.83 \pm 0.09^*$

* Represent significant differences ($p < 0.001$).

As might be expected, CSP-P407 hydrogel is the sample that extrudes most easily, but this could cause administration problems due to spillage. The reference sample has the highest extrusion value, indicating that it requires the maximum force to be extruded from the applicator. In contrast, CSP-CTS/P407 hydrogel shows better extrudability than CSP-CTS hydrogel. Based on these results, the hydrogel formed by the combination of both polymers shows the best extrudability properties.

2.1.7. Evaluation of Mucoadhesion Properties

The mucoadhesive properties of vaginal formulations are essential due to the self-cleaning of the vagina. When compared the ZP data of the mucin solution with the ZP data obtained for the hydrogel-mucin mixtures, it was observed that the ZP value of the mucin dispersion, -12.86 ± 0.70 mV, changed when mixed it with the samples as shown in Figure 5. This change in value would be due to the interactions of the negative groups, such as carboxylate (COO^-) and sulfonate (SO_3^-) of mucin with the positive groups of the polymers [63]. A polymer with mucoadhesive properties is able to neutralize the mucin charge [64]. The hydrogel that showed the maximum displacement was CSP-CTS, 58.47 ± 3.46 mV, confirming the mucoadhesive properties attributed to CTS due to its cationic nature [65], followed by CSP-CTS/P407, the reference and CSP-P407 with ZP values of 35.59 ± 3.15 , -7.92 ± 0.98 and -3.89 ± 0.36 mV, respectively.

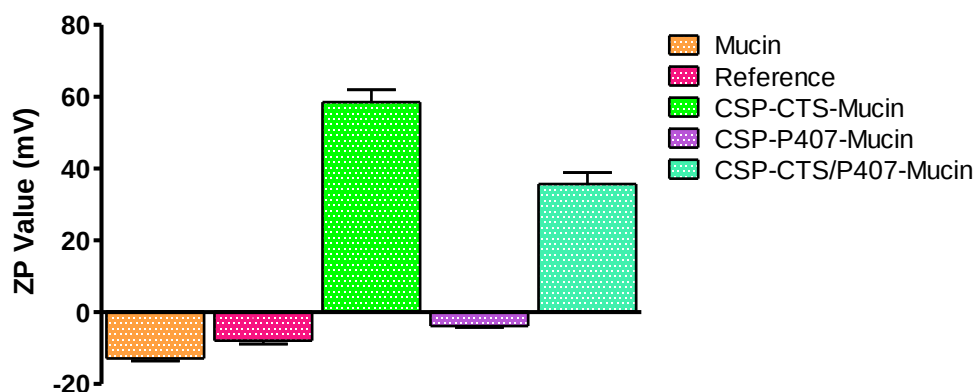


Figure 5. Zeta potential of mucin solution, CSP-CTS-Mucin solution, CSP-P407-Mucin solution and CSP-CTS/P407-Mucin solution. Results are expressed as mean values $\pm$ SD ($n = 9$).

2.2. In Vitro Release and Kinetic Evaluation

The release profiles of the CSP hydrogels can be observed in Figure 6. After 8 h, the highest cumulative drug release was registered for CSP-P407 hydrogel. Its micellar properties provide a system with excellent solubility [66]; followed by CSP-CTS/P407 and CSP-CTS.

The results of model fitting showed different release profiles for samples. CSP-CTS and CSP-CTS/P407 were adjusted to a Fickian kinetic model while CSP-P407 was adjusted to a sigmoidal model. Based on each equation, the release rates for CSP-CTS, CSP-P407, and CSP-CTS/P407 were 0.20 h^{-1} , 0.85 h^{-1} and 0.65 h^{-1} , respectively.

In order to compare the biopharmaceutical profile of all formulations, some amodelistic parameters (Figure 7) such as mean dissolution time (MDT), area under the curve (AUC) and efficiency (E) were calculated. CSP-CTS/P407 presents the lowest value of MDT, 1.7 h, compared to 2.9 and 3.2 h of CSP-P407 and CSP-CTS, respectively. This fact indicates that among three formulations, one of them is able to release the drug most rapidly and it could provide better bioavailability in the tissue. The AUC results are statistically different, being lower for CSP-CTS, $2660.0 \mu\text{g/h}$, and higher for CSP-P407, $14,785.3 \mu\text{g/h}$. Regarding the results of efficiency, CSP-

CTS/P407 shows the highest value, 78.6%. Probably, the interconnected porous morphology of CSP-CTS/P407 favors a better distribution of the drug within the hydrogel compared to the chains and agglomerated micelles of CSP-CTS and CSP-P407, respectively.

2.3. Ex Vivo Permeation of Caspofungin through Vaginal Mucosa

The vagina is a non-invasive route of administration in women that provides both a local and systemic effects. The aim of this study is to demonstrate that the therapeutic effect occurs locally in the vaginal mucosa. This is essential for fungal infections because fungi, mainly spp., colonize the mucosal surface [67]. Therefore, a certain degree of permeation and retention of the drug in the tissue is necessary without reaching or exceeding systemic therapeutic levels, $C_{min}=3.55\text{ }\mu\text{g/mL}$ and $C_{max}=11.73\text{ }\mu\text{g/mL}$ [68–70]. Porcine and human vaginal mucosas are substantially similar. Hence, porcine vaginal mucosa was used for permeation studies [57]. There are not previous studies reporting permeation parameters of CSP through vaginal porcine mucosa.

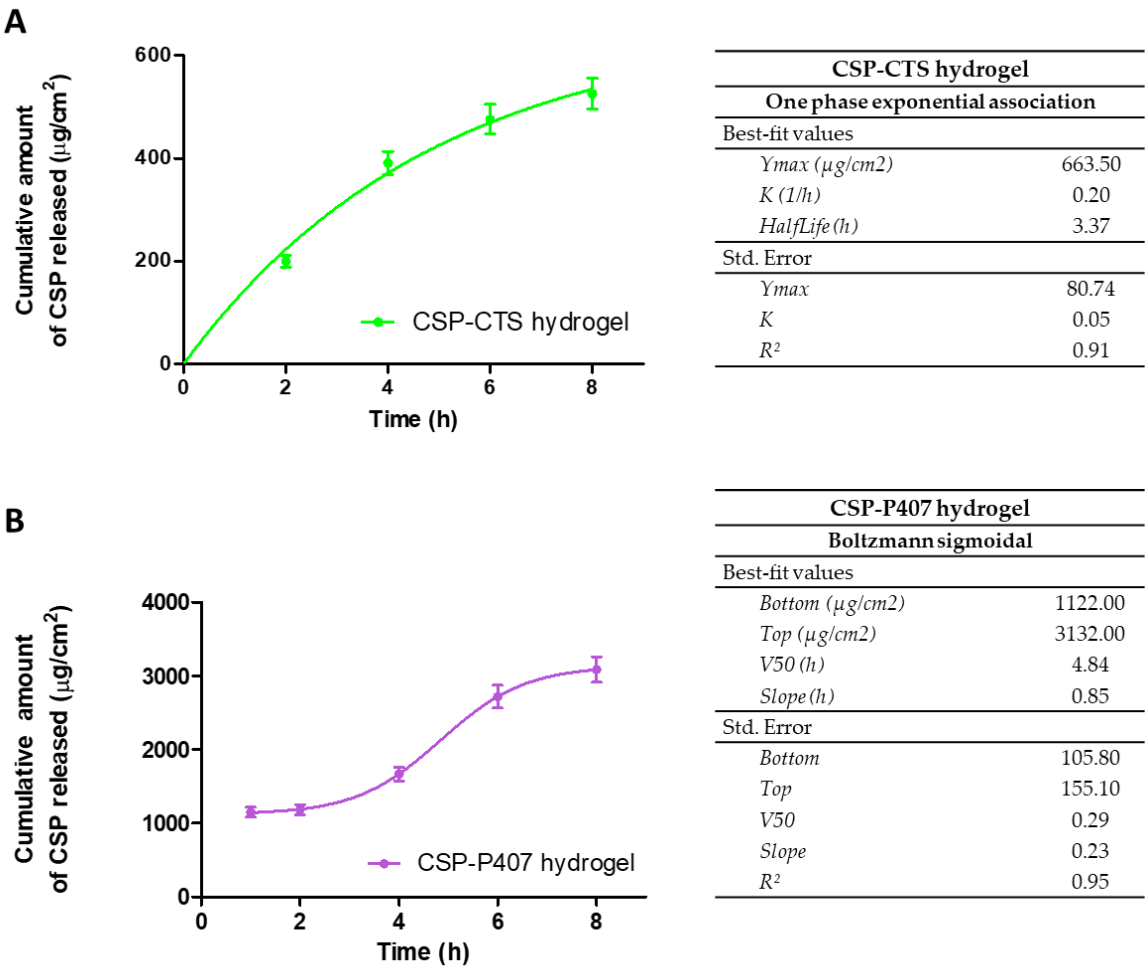


Figure 6. Cont.

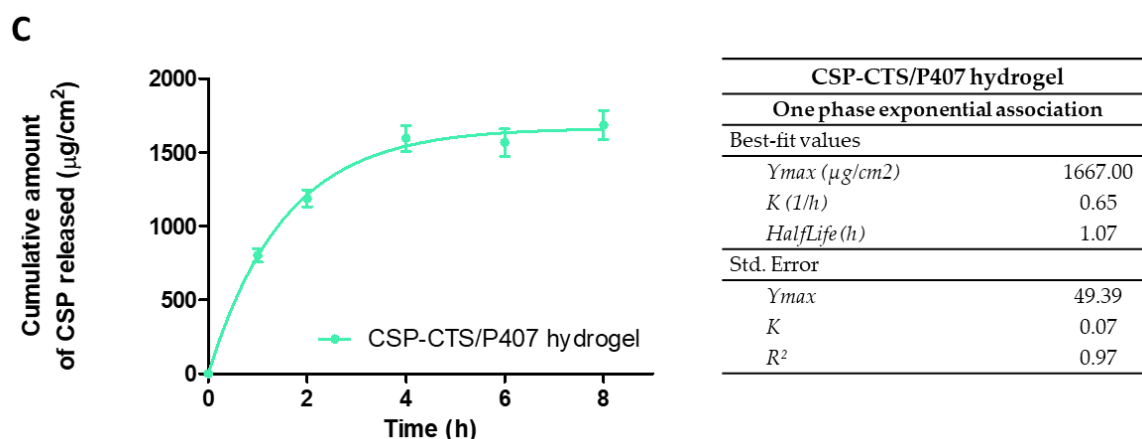


Figure 6. Cumulative amounts of CSP released from: (A) CSP-CTS hydrogel at 37°C; (B) CSP-P407 hydrogel at 37°C; and (C) CSP-CTS/P407 hydrogel at 37°C. Data represent mean $\pm$ SD ($n = 3$).

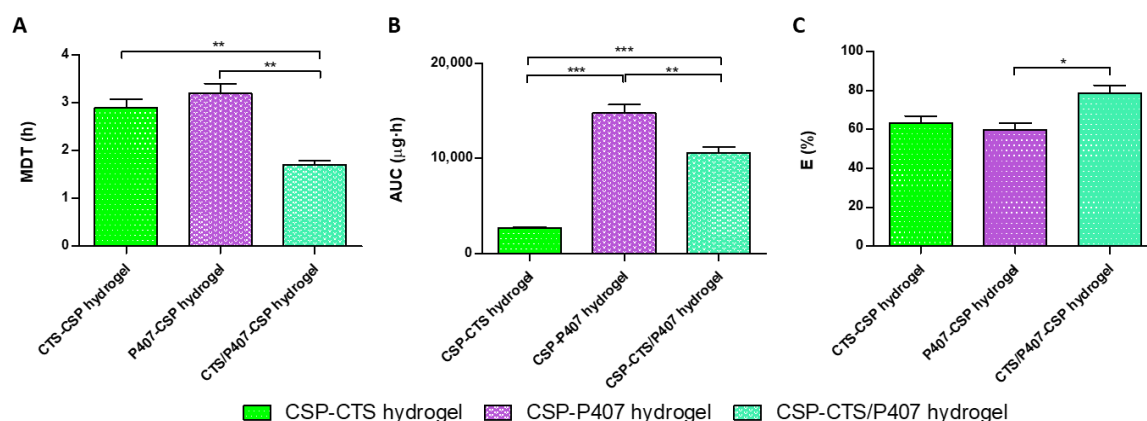


Figure 7. Non-modelistic parameters of: (A) mean dissolution time, MDT; (B) area under the curve, AUC; and (C) efficiency, E (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

Figure 8 illustrates the permeation profiles of CSP hydrogels through vaginal mucosa. The highest permeation profile was found for CSP-CTS hydrogel, followed by CSP-P407, and finally, CSP-CTS/P407. CTS has the capacity to interact with epithelial tight junctions increasing drug penetration [63,71]. Additionally, P407 is a potential enhancer for transmucosal drug delivery [72], due to their surfactant properties [73]. Interestingly, CSP-CTS/P407 hydrogel showed the lowest absorption, and will predictably produce the fewest side effects.

The calculated permeation kinetics parameters and CSP retained amount are reported in Table 4. Taking into account an application surface area of 62.8 cm² for the vaginal cavity [74], and a plasmatic clearance (Cl_p) of 0.55 L/h [68–70], the theoretical human plasmatic steady-state concentration (Cl_{ss}) that CSP would achieve was also calculated, being 1.65 ± 0.01 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 0.95 ± 0.22 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and 1.43 ± 0.12 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for CSP-CTS, CSP-P407 and CSP-CTS/P407, respectively. Therefore, no systemic side effects related to the use of CSP are expected. Finally, the amount of CSP remaining in the vaginal mucosa for CSP-CTS, CSP-P407 and CSP-CTS/P407, resulted to be 156.23 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, 118.51 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ and 409.40 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, respectively.

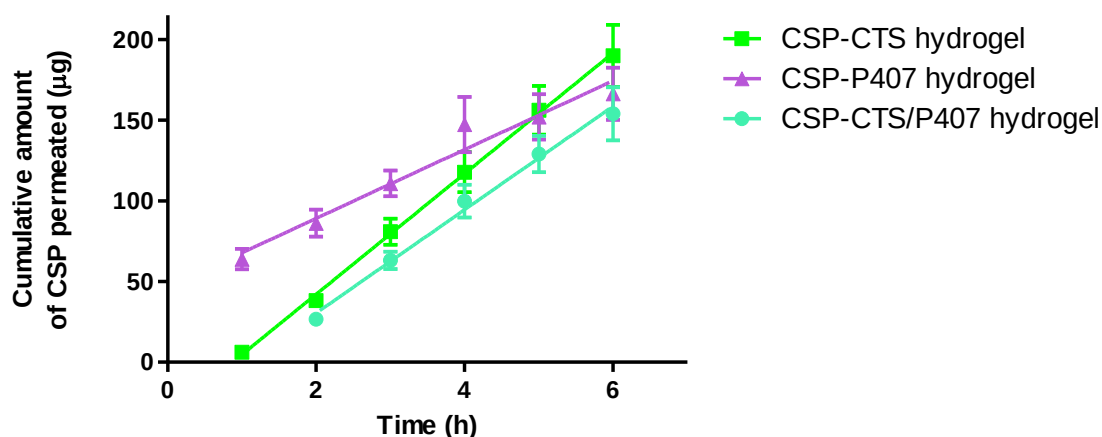


Figure 8. Cumulative amount of CSP permeated (μg) through vaginal mucosal upon application of CSP hydrogels. Each value represents the mean $\pm$ SD ($n = 3$).

To obtain the maximum therapeutic efficacy of the antifungal treatment, the formulation must remain long enough and at high concentration in the vaginal epithelium [75]. Based on the obtained data, the proposed formulation that is able to penetrate and retain significant amounts of CSP in the vaginal mucosa is CSP-CTS/P407 hydrogel. Then this is the best formulation to ensure a local action.

Table 4. Estimated permeation and retention parameters of CSP hydrogels. Values are reported as the mean $\pm$ SD ($n = 3$).

Biopharmaceutical Parameter	Formulations			Statistic $p < 0.05$
	CSP-CTS Hydrogel ¹	CSP-P407 Hydrogel ²	CTS/P407 Hydrogel ³	
J ($\mu\text{g}/\text{h}$)	36.76 ± 0.31	21.08 ± 4.98	31.84 ± 2.76	1 vs. 2 2 vs. 3
$K_p \times 10^4$ (cm/h)	7.24 ± 0.06	4.15 ± 0.98	6.27 ± 0.54	1 vs. 2 2 vs. 3
C_{ss} ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	1.65 ± 0.01	0.95 ± 0.22	1.43 ± 0.12	1 vs. 2 2 vs. 3
Q_r ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	156.23 ± 14.91	118.51 ± 12.78	409.40 ± 48.34	1 vs. 3 2 vs. 3

2.4. Histological Evaluation

The histomorphological analysis of the vaginal mucosa was performed under light microscope. Representative images of assayed treatments are shown in Figure 9. The non-keratinized stratified squamous vaginal epithelium (about 6–7 layers of cells) can be shown in control conditions (Figure 9A). A treatment with ethanol was performed as a positive control to show altered epithelium. The ethanol only induced a contraction of the epithelium. The treatment with CSP-CTS and CSP-CTS/P407 (Figure 9C, D, respectively) conserved the thickness of the epithelium whereas the treatment with CSP-P407 hydrogel (Figure 9E) induced the loss of some of the outermost layers during the processing of the samples.

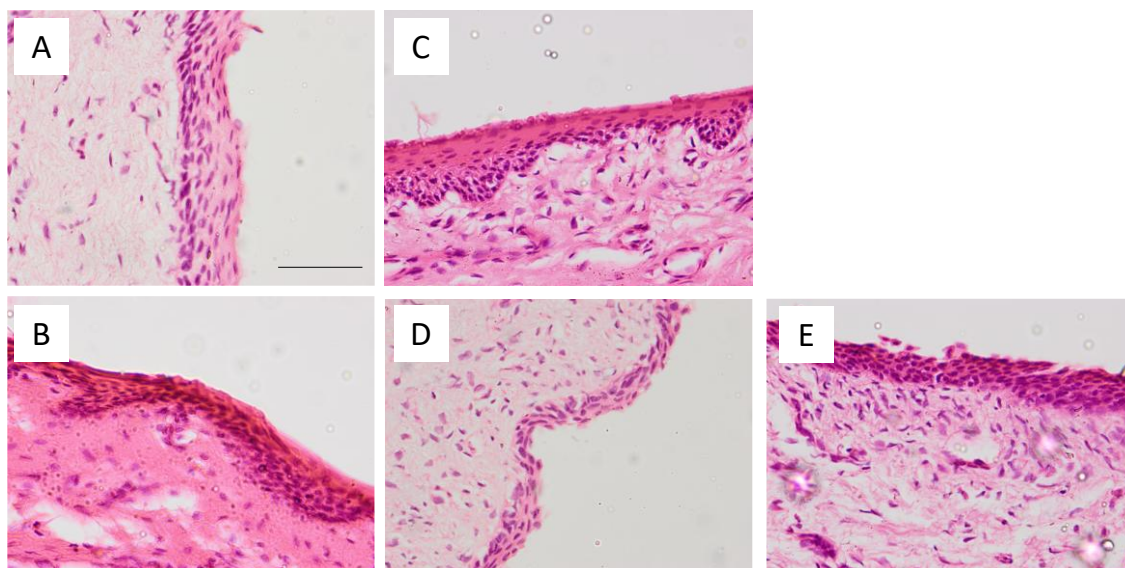


Figure 9. Histological sections of vagina stained with haematoxylin and eosin of: (A) normal vaginal mucosa; (B) damaged vaginal mucosa with ethanol; (C) vaginal mucosa treated with CSP-CTS hydrogel; (D) vaginal mucosa treated with CSP-P407 hydrogel; and (E) vaginal mucosa treated with CSP-CTS/P407 hydrogel. Scale bar = 50 μ m, magnification = 400 $\times$.

2.5. Antifungal Efficacy

The antimicrobial activity study of the CSP-loaded hydrogels has shown that they are effective on different species of *Candida*, producing wide areas of inhibition, and demonstrating the effectiveness of these products. Although for *C. auris* DSM 21092 they strongly inhibit after 24 h of incubation, a small resistant growth was found in the initial inhibition area at 48 h and, consequently, they would not be useful to eliminate this strain.

In the case of blank formulations (CTS, P407 and CTS/P407 hydrogels without CSP), it was observed that they prevent the development of studied yeasts at the point where samples were applied on the agar plate. These formulations contain CTS, which has been reported to possess antimicrobial activity against a wide range of microorganisms, such as bacteria, fungi, and yeast [35,76,77]. The formulations did not allow development at the point of application and did not diffuse into the agar surface as the CSP-loaded hydrogels did. An inhibitory action of CTS on fungal growth was evidenced, but it seems as previously described [78] that it largely depends on the physicochemical characteristics.

The results obtained are summarized in Table 5. CSP-CTS, CSP-P407 and CSP-CTS/P407 hydrogels would be useful for the treatment of VVC, as they have been effective in eliminating four of the *Candida* spp. tested.

Table 5. Antimicrobial activity of CSP-CTS, CSP-P407 and CSP-CTS/P407 hydrogels; and CTS, P407 and CTS/P407 hydrogels.

	Yeast Tested				
	<i>C. albicans</i> ATCC 10231	<i>C. auris</i> DSM 21092	<i>C. tropicalis</i> ATCC 7349	<i>C. glabrata</i> ATCC 66032	<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019
Production of large areas of inhibition					
CSP-CTS hydrogel	+	R ^(b)	+	+	+
CSP-P407 hydrogel	+	R	+	+	+
CSP-CTS/P407 hydrogel	+	R	+	+	+
Inhibition of fungi <i>in situ</i> where the sample has been deposited					
CTS hydrogel	+r ^(c)	+r	+	+	+
P407 hydrogel	+	+	+	+	–
CTS/P407 hydrogel	+r	+r	+	+	+

(a) +; formulation totally effective against the strain tested; – formulation does not produce any type of action on yeast growth.

(b) R; There is a very marked inhibition effect on yeast growth at 24 h, but when incubating for longer up to 48 h, resistant growth appears within the first inhibition zone. (c) +, – o +r; Regarding the antifungal activity of the excipients at the point where the sample has been placed, whether they have inhibited growth, +, or not, –, or inhibit with resistant growth, +r.

3. Conclusions

In this work, CSP-loaded hydrogels of CTS, P407 and combination of both have been developed for the first time aimed for the treatment of VVC. All formulations were extensively characterized. The CSP-CTS/P407 hydrogel, formed by the combination of both polymers, proved to be the best formulation for topical administration of CSP against fungal infections. This hydrogel showed better spreadability and extrudability properties than the reference formulation, important factor to evaluate in topical application. It has excellent mucoadhesive properties, essential for formulations destined for vaginal drug administration. In addition, it was shown to be the formulation that retained the highest amount of CSP in the vaginal mucosa, providing the desired local therapeutic effect. It should therefore not cause any systemic side effects. The hydrogel was well tolerated by the vaginal mucosa because no significant mucosal barrier disruption or irritability was observed. These results demonstrate that CSP-CTS/P407 hydrogel is a stable, suitable and safe formulation for the treatment of VVC.

4. Materials and Methods

4.1. Materials

4.1.1. Chemical and Reagents

CSP acetate salt was supplied from SunPharma (Barcelona, Spain). Trifluoroacetic acid, methanol, mucin from porcine stomach type III and medium molecular weight CTS (190–310 KDa molecular weight, ≥75% deacetylated) were purchased from Sigma Aldrich (Madrid, Spain). Pluronic® F-127 (P407) was provided by BASF (Barcelona, Spain). Acetic acid was obtained from Panreac (Barcelona, Spain). Physiological saline 0.9% was supplied by Grifols Laboratories S.A (Barcelona, Spain). Double distilled water was used after filtration in a Milli-Q® Gradient A10 system apparatus (Millipore Iberica S.A.U.; Madrid, Spain). Commercial formulation of clotrimazole (Gine-Canestén®, 20 mg/g) for vaginal application was obtained from a local pharmacy. Ketamine HCl was purchased from Pfizer (Madrid, Spain). Xylazine was obtained from Laboratories Calier (Barcelona, Spain). Midazolam, propofol and sodium thiopental were supplied by B. Braun Medicals (Barcelona, Spain). Isoflurane was purchased from Baxter (Valencia, Spain). Hank's balanced salt solution (HBSS) (Composition in g/L: CaCl₂ = 0.14; KCl = 0.14; KH₂PO₄ = 0.06; MgSO₄ = 0.1; MgCl₂ = 0.1; NaCl = 8.0; NaHCO₃ = 0.35; Na₂HPO₄ = 0.09; Glucose = 1) was obtained from Biological Industries (Kibbutz Beit Haemek, Israel).

Polytetrafluoroethylene (PTFE) membranes were acquired from Pall® Corporation (Madrid, Spain). All other chemicals and reagents used in this study were all of analytical grade.

4.1.2. Biological Tissue for *Ex Vivo* Assays

Vaginal mucosa tissues were obtained from pigs in accordance with protocols prescribed by the Animal Experimentation Ethics Committee of the University of Barcelona, Spain (CEE-UB) code 10617. Female pigs weighing 20–25 kg, were anesthetized with intramuscular administration of ketamine HCl (3 mg/kg), xylazine (2.5 mg/kg) and midazolam (0.17 mg/kg). Propofol (3 mg/kg) was administered via atrial vein after sedation and immediately afterwards they were intubated and maintained under anesthesia inhaled with isoflurane. Finally, three animals were sacrificed under veterinary supervision at the Animal Facility of the Bellvitge Campus of the University of Barcelona (Spain) using an overdose of sodium thiopental. Vaginal mucosa tissues were maintained in HBSS and refrigerated until experiments [79]. Before use, the vaginal mucosa tissues were superficially cleaned with gauze soaked in 0.05% dodecyl sulphate solution, followed by distilled water.

4.2. Preparation of CSP Hydrogels

Firstly, blank CTS hydrogel was prepared by dispersion of appropriate amount of CTS (2%, *w/v*) in 1% aqueous acetic acid, previously prepared, with continuous stirring until homogenization. Subsequently, CSP loaded CTS hydrogel (CSP-CTS hydrogel) was obtained by solubilization of CSP in blank CTS hydrogel by manual stirring, yielding at 2% (*w/v*) hydrogel of CTS and CSP.

CSP loaded P407 hydrogel (CSP-P407 hydrogel) was elaborated as follows; a concentration of 20% (*w/v*) P407 and 2% (*w/v*) CSP were mixed and stirred overnight at 4°C.

On the other hand, to prepare CSP loaded CTS/P407 hydrogel (CSP-CTS/P407 hydrogel), an appropriate amount of P407 and CSP was pre-mixed and kept at 4°C. This mixture was dispersed in a pure CTS hydrogel to reach a final concentration of 2% (*w/v*) for CTS and CSP, and 20% (*w/v*) for P407. The formation of this hydrogel is represented schematically in Figure 10.

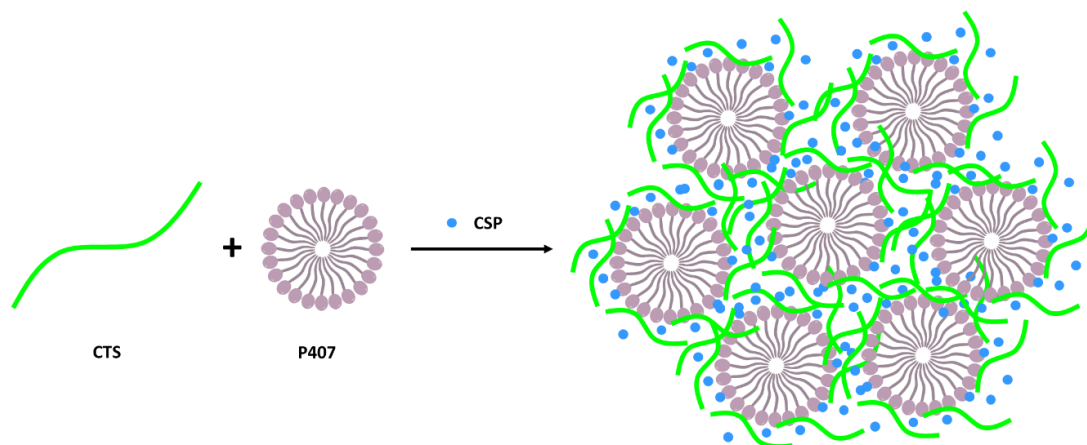


Figure 10. Schematic representation of the formation of the CSP-CTS/P407 hydrogel.

After preparation of hydrogels no insoluble particles were observed. Therefore, all samples were stored at 4°C.

4.3. Physical Characterization of CSP Hydrogels

4.3.1. pH Measurements

The determination of the pH values of samples was performed using a digital pH/mV-meter-pH 200 (Crisson Instruments S.A., Barcelona, Spain). Measurements of samples were conducted at 25 °C with the hydrogel freshly prepared and stored in a refrigerator ($4.00 \pm 1.00^\circ\text{C}$) two months after preparation. Readings were recorded as the mean $\pm$ standard deviation (SD) of three replicates.

To mimic application conditions, the formulations were mixed with SVF, which was prepared by mixing NaCl 3.510 g, KOH 1.400 g, $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 0.220 g, bovine serum albumin 0.018 g, lactic acid 2.000 g, acetic acid 1.000 g, glycerol 0.160 g, urea 0.400 g and glucose 5.000 g to 900 mL of distilled water in a beaker, and stirred until completely dissolved. The pH of the mixture was then adjusted to 4.5 using HCl, and the final volume was adjusted to 1 L [50,80].

4.3.2. Morphological Studies

To analyze the structure of developed formulations a JEOL JSM-7001F scanning electron microscope (JEOL Ltd., Peabody, MA, USA) was used. The CSP hydrogels were dried for 5 days using a temperature-controlled heater. Once they have dried, a small quantity of each sample was fixed on a double-coated carbon conductive tape and coated with a thin layer of carbon as a conductor agent in an Emitech K950 coater (Quorum Technologies Ltd., Kent, UK). Finally, the samples were observed in high vacuum mode.

4.3.3. Surface Electrical Properties

The surface electrical properties were assessed based on the method previously described by Shaarani et al. [53]. The ZP measurements of unloaded and loaded hydrogels were performed at $25 \pm 0.5^\circ\text{C}$ using a Zetasizer® 2000 (Malvern Instruments Ltd., Worcestershire, UK). Before measuring, the samples were diluted 100 times in double distilled water. Values are reported as the mean $\pm$ SD of nine replicates.

4.3.4. Rheological Behavior

The rheological characterization of the samples was performed 24 h after hydrogels preparation using a Haake RheoStress 1 rheometer connected to a temperature control Thermo Haake Phoenix II + Haake C25P (Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe, Germany). It was equipped with a parallel plate-plate geometry set-up including a fixed bottom plate and a Haake PP60Ti movable upper plate (60 mm diameter) and operated using Haake RheoWin® Job Manager and Data Manager software v. 4.87.

Rotational tests were carried out to determine the viscosity and flow behavior of the formulations. Each sample was equilibrated by placing it between the plate-plate sensor system (0.5 mm gap) for 5 min to attain the running temperature (4, 25 and 37°C). Then, they were submitted to a three steps shear profile program: a ramp-up period ($0-50 \text{ s}^{-1}$) for 3 min, constant shear rate period at 50 s^{-1} for 1 min and a ramp-down period ($50-0 \text{ s}^{-1}$) for 3 min. The data from the flow curves (shear stress (τ) versus shear rate ($\dot{\gamma}$)) were fitted to different mathematical models (Newton, Bingham, Ostwald-de-Waele, Herschel-Bulkley, Casson and Cross) [81,82]. The model that statistically best described the experimental data was selected based on the best correlation coefficient value (r).

The apparent thixotropy was determined by the presence or the absence of a hysteresis loop. Viscosity mean values ($\text{Pa}\cdot\text{s}$) were determined at 50 s^{-1} from the constant share rate period of each viscosity curve (viscosity (η) versus shear rate ($\dot{\gamma}$)).

In addition, the thermosensitive gelation process of the CSP-P407 hydrogel was investigated upon temperature sweeping from 10 to 40°C under oscillation mode with a fixed frequency of 1 Hz and a constant stress of 0.5 Pa. Each sample was equilibrated by placing it between the plate-plate system for 5 min to attain the start temperature of 4°C. Then the temperature was increased from 10 to 40°C at a controlled ramp speed for 2000 s and the modules G' and G'' , as well as complex viscosity (η^*) were measured.

The temperature at which a sharp rise in viscosity was detected (coinciding with the crossover point where $G' = G''$) was recorded as gelation temperature or SOL-GEL temperature transition ($T_{\text{SOL-GEL}}$) [83,84].

4.3.5. Spreadability Test

The extensibility test was evaluated for the CSP-CTS, CSP-P407, CSP-CTS/P407 hydrogels using a commercial formulation of clotrimazole, Gine-Canestén® (20 mg/g) as reference. To evaluate this property, 0.5 g of each sample was placed within a circle pre-marked on a glass plate over which a second glass plate was overlapped, as focused as possible, without sliding of the plates. Force was generated onto the upper plate by adding known weights (5, 10, 20, 30, 40, 50, 100, 150 and 200 g). So, the samples were compressed to uniform thickness. The weights were removed after 60 s and the area was recorded. The results were expressed in terms of the spreading area as a function of the applied mass according to the following equation:

$$S = d^2 \times \pi/4 \quad (1)$$

where S is the spreading area (cm^2) resulting from the applied mass (g), and d is the mean diameter (cm) reached by the sample. Each sample was measured in triplicate for each weight at room temperature.

Finally, the spreadability results were fitted to mathematical equations (Boltzmann, hyperbola one site and hyperbola two sites). The goodness of the fitting was confirmed by r value.

4.3.6. Extrudability Study

This test measures the required force to remove the hydrogel from the container. The syringeability of the developed hydrogels was measured in terms of the weight necessary to be applied to remove a known amount of hydrogel from a vaginal applicator (Figure 11).

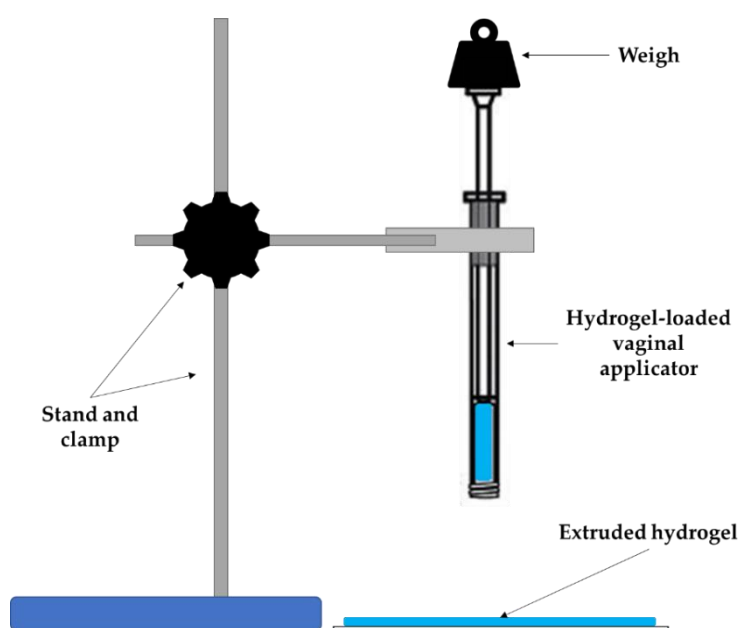


Figure 11. Schematic illustration of the device used for evaluation of spreadability study.

For that purpose 5 g of each formulation was carefully loaded into vaginal applicators avoiding the formation of air bubbles. The device was vertically placed on a support and known weights were added to its plunger. The plunger was pressed down and the extruded weight was recorded. The system was maintained at $4 \pm 0.50^{\circ}\text{C}$, to simulate application conditions.

The syringeability of developed CSP hydrogels was calculated according to the following equation:

$$E = W/A \quad (2)$$

where W is the weight applied (g) to extrude the sample from the applicator and A the area (cm^2) of the extruded hydrogel from the vaginal applicator. The data obtained were expressed as the mean $\pm$ SD of three replicates.

4.3.7. Evaluation of Mucoadhesion Properties

The mucoadhesive property of CSP formulations was evaluated by measuring the influence of the samples on the zeta potential of mucin [85]. Each sample was dispersed with an equivalent amount of porcine mucin solution 1% (*w/v*) under continuous stirring. The mixtures of hydrogel-mucin were allowed to equilibrate overnight at room temperature. The surface charge of samples was detected using a Zetasizer® 2000 (Malvern Instruments Ltd., Worcestershire, UK). Readings were recorded as the mean $\pm$ SD of nine replicates.

4.4. *In Vitro* Release and Kinetic Evaluation

The *in vitro* release study of CSP from the hydrogels was performed using amber glass vertical diffusion Franz cells (FDC 400, Crown Glass, Somerville, NY, USA) of 12 mL volume receiver chamber and 2.54 cm^2 effective diffusional area. Polytetrafluoroethylene membranes (wvPTFE 0.45 μm 47 mm discs) were mounted between the donor and receptor compartment. The receptor fluid consisted of physiological saline 0.9%, which was kept under continuous stirring (600 rpm). The system was maintained at $37 \pm 0.50^{\circ}\text{C}$, to simulate vaginal conditions *in vivo*.

Drug release studies were carried out by placing a known amount of CSP hydrogels on the donor compartment. Air bubbles under the membranes were removed and the system was allowed to equilibrate for at least 30 min before samples were applied. To prevent evaporation of the donor compartment and sampling ports, these were sealed with parafilm. At different scheduled times during 8 h, samples of receptor compartment were collected and the same volume was immediately replaced with tempered physiological saline. The collected samples were analyzed for CSP content by Ultra Performance Liquid Chromatography (UPLC) methodology previously validated according to ICH Q2 (R1) guidelines. Values are reported as the mean $\pm$ SD of three replicates. The data obtained were fitted to various mathematical models (One phase exponential association, Boltzmann sigmoidal, one site binding) to determine the release kinetics. The model was chosen according to the best r^2 value.

Furthermore, some amodelistic parameters such as mean dissolution time (MDT), the area under the curve (AUC), and efficiency (E) were also estimated. MDT is the mean dissolution time of the CSP in the formulation along the process. AUC represents the amount of CSP that is released from the formulation and E the efficiency.

4.5. *Ex Vivo* Permeation of CSP through Vaginal Mucosa

The *ex vivo* drug permeation study of CSP was carried out using amber glass vertical diffusion Franz cells (FDC 400, Crown Glass, Somerville, NY, USA). Porcine vaginal mucosae were used as permeation membranes with the epithelium region facing the donor compartment and the connective region facing the receiver compartment. The receptor compartments were

filled with physiological saline 0.9%, which were kept under continuous stirring at 600 rpm and maintained at $37 \pm 0.5^\circ\text{C}$. Sink conditions were ensured throughout the study. At different scheduled times samples of receptor compartment were collected via syringe and the same volume was immediately replaced with physiological saline for 6 h. The collected samples were analyzed for drug content by UPLC. Three determinations were made for each sample from the same donor to avoid variability due to membranes. Values are reported as the mean $\pm$ SD.

4.5.1. Calculation of the Permeation Parameters

The cumulative amounts of CSP (μg) that had penetrated per unit of vaginal mucosa surface area (cm^2) were collected and plotted versus time (h). Permeation parameters as flux (J , $\mu\text{g}/\text{h}$) was calculated by plotting the cumulative amount of permeated drug against time by using the Prism® software v. 5.00 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). The slope of the linear regression was also determined.

The permeability coefficients (K_p , cm/h) were obtained according to the following equation:

$$K_p = J/C_0 \quad (3)$$

where C_0 is the initial drug concentration in the donor compartment, $20,000 \mu\text{g}/\text{mL}$.

The predicted drug steady-state plasma concentration (C_{ss} , $\mu\text{g}/\text{mL}$) that would penetrate after topical application was calculated using the equation:

$$C_{ss} = J \times A/Cl_p \quad (4)$$

where C_{ss} is the plasma steady-state concentration, J the flux determined in this study, A the hypothetical area of application (62.8 cm^2) and Cl_p the plasmatic clearance ($0.55 \text{ L}/\text{h}$) [68–70].

Finally, the data obtained from permeation studies as a function of time were fitted to different mathematical models to determine the kinetics.

4.5.2. Amount of CSP Retained in the Vaginal Mucosa

In order to detect differences between formulations, the quantity of CSP remaining on the vaginal mucosal, Q_r ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$), was also determined. For this, after permeation assays, the residual CSP hydrogel on the vaginal mucosa membranes was removed using a swab. The tissues were taken out of the device and cleaned with gauze soaked in sodium lauryl sulphate 0.05% and washed with distilled water. The permeation areas of the vaginal mucosa membranes were cut, weighed, perforated with a thin needle and immersed in 2 mL of physiological saline 0.9% for 15 min using an ultrasonic bath. Samples were analyzed by UPLC.

4.6. Analysis of CSP in Solution

The UPLC system consisted in an Acquity I CLASS UPLC System (Waters, Milford, CT, USA) coupled to an Acquity TUV and an Acquity Fluorescence Detector. Fluorescence detection was carried out at 224 and 304 nm for excitation and emission wavelengths, respectively.

The chromatography separation was performed with a Lichrospher RP-8 column ($125 \times 4 \text{ mm}$, $5 \mu\text{m}$, Phenomenex). The method had the column at room temperature. The flow rate and the injection volume were $0.8 \text{ mL}/\text{min}$ during 8 min and $10 \mu\text{L}$, respectively. The mobile phase A consisted of 0.1 % of trifluoroacetic acid (TFA) in Milli-Q® water and mobile phase B comprised methanol. The gradient elution program was: 50–50% B for 0–5 min; 100% B for 5–6 min; 50–50% B for 6–8 min.

4.7. Histological Evaluation

The hydrogel formulations were applied for 6 h to study the vaginal mucosal. Then, the tissue was removed from the Franz cell rinsed with PBS pH 7.4, and set overnight in 4% buffered formaldehyde and embedded in paraffin wax. Transversal sections (6 μ m) were stained with hematoxylin and eosin and observed for the evaluation of the histomorphology under a light microscope Olympus BX41 equipped with Olympus XC50 camera (Olympus Co., Tokyo, Japan). Tissues without gel (blank vaginal mucosa) and with ethanol (damaged vaginal mucosa) were used as the control and positive control conditions, respectively.

4.8. Antifungal Efficacy

Antifungal activity of developed formulations was tested by using a modification of the Kirby-Bauer disk diffusion test [86]. Basically, the methodology described in the Test Protocol [87] was followed without using disk, but using the capacity to diffuse around the place of the agar where product has been deposited. Five strains of *Candida* were used to study antimicrobial activity: *Candida albicans* ATCC 10231 (American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA), *Candida auris* DSM 21092 (German collection of Microorganisms and cell cultures GmbH), *Candida tropicalis* ATCC 7349, *Candida glabrata* ATCC 66032 and *Candida parapsilosis* ATCC 22019. The yeast strains were first grown aerobically in Mueller-Hinton (MH) medium supplemented with glucose 2% at 30°C for 48 h. The fungi inoculums were prepared by suspending colonies in Ringer's solution to achieve the desired density equivalent to the 0.5 McFarland. MH-glucose 2% plates were inoculated three times over the entire agar surface with the help of a yeast-soaked swab by streaking action, rotating the plate approximately 60° each time to ensure an even distribution of the inoculum that result in a confluent lawn of growth.

The following formulations were studied: CSP-CTS, CSP-P407 and CSP-CTS/P407 hydrogels; CTS, P407 and CTS/P407 hydrogels and controls of nystatin 100 UI/mL and amphotericin B 250 μ g/mL. About 5 μ L of these products were placed onto de yeast inoculated MH-glucose 2% agar. Plates were incubated at 30°C during 48 h. The zone of inhibition for growth of yeasts was observed. Formulations CTS, P407 and CTS/P407 hydrogels were also tested in a MH-glucose 2% medium where 500 μ g/mL chloramphenicol was added to avoid possible bacterial contamination on excipients.

4.9. Statistical Analysis

Experimental data were statistically evaluated by one-way analysis of variance (ANOVA) using the GraphPad Prism® software v. 5.00 (Graphpad Software Inc., San Diego, CA USA). Differences were considered significant at $p < 0.05$ level. To determine the differences between independent groups, Tukey's test was applied, adopting a confidence level of 95%.

Author Contributions: N.P.-G.: Investigation, methodology, writing—original draft, formal analysis; J.A.M.-M.: investigation, methodology; A.C.C.-C.: conceptualization, investigation, methodology, formal analysis, funding acquisition, supervision; A.N.-R.: investigation, methodology; M.J.R.-L.: investigation, methodology; N.B.-d.F.: investigation, methodology; J.L.S.-R.: investigation, methodology, review & editing; F.F.-C.: investigation, methodology, review & editing; B.C.-N.: conceptualization, investigation, methodology, writing—original draft, formal analysis, funding acquisition, supervision. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by the Spanish National Research Council (CSIC), project no. 202080E231, and the Agreement with the University of Barcelona and the University of Granada (Official State Gazette 311, on 27 November 2020).

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: The data presented in this study are available on request from the corresponding author. The data are not publicly available due to they are part of a Doctoral Thesis and it will be available once the Thesis will be published.

Acknowledgments: The authors would like to thank to AG Sanding from animal facility (University of Barcelona) for his valuable help in animal studies, as well as MJM Lopez and E Giannone from the University of Barcelona for their excellent technical support.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Sobel, J.D. Vulvovaginal Candidosis. *Lancet* **2007**, *369*, 1961–1971. [[CrossRef](#)]
2. Pandey, M.; Choudhury, H.; Abdul-Aziz, A.; Bhattamisra, S.K.; Gorain, B.; Carine, T.; Toong, T.W.; Yi, N.J.; Yi, L.W. Promising Drug Delivery Approaches to Treat Microbial Infections in the Vagina: A Recent Update. *Polymers* **2020**, *13*, 26. [[CrossRef](#)]
3. Albertini, B.; Passerini, N.; Di Sabatino, M.; Vitali, B.; Brigidi, P.; Rodriguez, L. Polymer-Lipid Based Mucoadhesive Microspheres Prepared by Spray-Congelation for the Vaginal Delivery of Econazole Nitrate. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2009**, *36*, 591–601. [[CrossRef](#)]
4. Balkus, J.E.; Srinivasan, S.; Anzala, O.; Kimani, J.; Andac, C.; Schwebke, J.; Fredricks, D.N.; McClelland, R.S. Impact of Periodic Presumptive Treatment for Bacterial Vaginosis on the Vaginal Microbiome among Women Participating in the Preventing Vaginal Infections Trial. *J. Infect. Dis.* **2017**, *215*, 723–731. [[CrossRef](#)]
5. Felix, T.C.; de Brito Röder, D.V.D.; dos Santos Pedroso, R. Alternative and Complementary Therapies for Vulvovaginal Candidiasis. *Folia Microbiol.* **2019**, *64*, 133–141. [[CrossRef](#)].
6. Lopez, J.E.M. Candidiasis (Vulvovaginal). *BMJ Clin. Evid.* **2015**, *2015*, 0815.
7. Cain, D.W.; Cidowski, J.A. After 62 Years of Regulating Immunity, Dexamethasone Meets COVID-19. *Nat. Rev. Immunol.* **2020**, *20*, 587–588. [[CrossRef](#)].
8. Arastehfar, A.; Carvalho, A.; Nguyen, M.H.; Hedayati, M.T.; Netea, M.G.; Perlin, D.S.; Hoenigl, M. COVID-19-Associated Candidiasis (CAC): An Underestimated Complication in the Absence of Immunological Predispositions? *J. Fungi* **2020**, *6*, 211. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
9. Song, G.; Liang, G.; Liu, W. Fungal Co-Infections Associated with Global COVID-19 Pandemic: A Clinical and Diagnostic Perspective from China. *Mycopathologia* **2020**, *185*, 599–606. [[CrossRef](#)]
10. Cook, M.T.; Brown, M.B. Polymeric Gels for Intravaginal Drug Delivery. *J. Control. Release* **2018**, *270*, 145–157. [[CrossRef](#)]
11. Pfaller, M.A.; Diekema, D.J. Rare and Emerging Opportunistic Fungal Pathogens: Concern for Resistance beyond *Candida Albicans* and *Aspergillus Fumigatus*. *J. Clin. Microbiol.* **2004**, *42*, 4419–4431. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Seyedmousavi, S.; Rafati, H.; Ilkit, M.; Tolooe, A.; Hedayati, M.T.; Verweij, P. Systemic Antifungal Agents: Current Status and Projected Future Developments. *Methods Mol. Biol.* **2017**, *1508*, 107–139.
13. Chen, S.C.A.; Slavin, M.A.; Sorrell, T.C. Echinocandin Antifungal Drugs in Fungal Infections: A Comparison. *Drugs* **2011**, *71*, 11–41. [[CrossRef](#)]
14. Denning, D.W. Echinocandin Antifungal Drugs. *Lancet* **2003**, *362*, 1142–1151. [[CrossRef](#)]
15. Boucher, H.W.; Groll, A.H.; Chiou, C.C.; Walsh, T.J. Newer Systemic Antifungal Agents: Pharmacokinetics, Safety and Efficacy. *Drugs* **2004**, *64*, 1997–2020. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Letscher-Bru, V.; Herbrecht, R. Caspofungin: The First Representative of a New Antifungal Class. *J. Antimicrob. Chemother.* **2003**, *51*, 513–521. [[CrossRef](#)]
17. Deresinski, S.C.; Stevens, D.A. Caspofungin. *Clin. Infect. Dis.* **2003**, *36*, 1445–1457.
18. McCormack, P.L.; Perry, C.M. Caspofungin: A Review of Its Use in the Treatment of Fungal Infections. *Drugs* **2005**, *65*, 2049–2068. [[CrossRef](#)]
19. Vanic, Ž.; Škalko-Basnet, N. Nanopharmaceuticals for Improved Topical Vaginal Therapy: Can They Deliver? *Eur. J. Pharm. Sci.* **2013**, *50*, 29–41. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

20. Ziemczonek, P.; Gosecka, M.; Gosecki, M.; Marcinkowska, M.; Janaszewska, A.; Klajnert-Maculewicz, B. Star-Shaped Poly(Furfuryl Glycidyl Ether)-Block-Poly(Glycerol Glycerol Ether) as an Efficient Agent for the Enhancement of Nifuratel Solubility and for the Formation of Injectable and Self-Healable Hydrogel Platforms for the Gynaecological Therapies. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 8386. [\[CrossRef\]](#)
21. Grisin, T.; Bories, C.; Bombardi, M.; Loiseau, P.M.; Rouffiac, V.; Solgadi, A.; Mallet, J.M.; Ponchel, G.; Bouchemal, K. Supramolecular Chitosan Micro-Platelets Synergistically Enhance Anti-Candida Albicans Activity of Amphotericin B Using an Immunocompetent Murine Model. *Pharm. Res.* **2017**, *34*, 1067–1082. [\[CrossRef\]](#)
22. Ravani, L.; Esposito, E.; Bories, C.; Moal, V.L.L.; Loiseau, P.M.; Djabourov, M.; Cortesi, R.; Bouchemal, K. Clotrimazole-Loaded Nanostructured Lipid Carrier Hydrogels: Thermal Analysis and in Vitro Studies. *Int. J. Pharm.* **2013**, *454*, 695–702. [\[CrossRef\]](#)
23. Ci, T.; Yuan, L.; Bao, X.; Hou, Y.; Wu, H.; Sun, H.; Cao, D.; Ke, X. Development and Anti-Candida Evaluation of the Vaginal Delivery System of Amphotericin B Nanosuspension-Loaded Thermogel. *J. Drug Target.* **2018**, *26*, 829–839. [\[CrossRef\]](#)
24. de Lima, J.A.; Paines, T.C.; Motta, M.H.; Weber, W.B.; dos Santos, S.S.; Cruz, L.; da Silva, C.B. Novel Pemulen/Pullulan Blended Hydrogel Containing Clotrimazole-Loaded Cationic Nanocapsules: Evaluation of Mucoadhesion and Vaginal Permeation. *Mater. Sci. Eng. C* **2017**, *79*, 886–893. [\[CrossRef\]](#)
25. Kenechukwu, F.C.; Attama, A.A.; Ibezim, E.C.; Nnamani, P.O.; Umeyor, C.E.; Uronnachi, E.M.; Gugu, T.H.; Momoh, M.A.; Ofokansi, K.C.; Akpa, P.A. Surface-Modified Mucoadhesive Microgels as a Controlled Release System for Miconazole Nitrate to Improve Localized Treatment of Vulvovaginal Candidiasis. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2018**, *111*, 358–375. [\[CrossRef\]](#)
26. Gafitanu, C.A.; Filip, D.; Cernătescu, C.; Ibănescu, C.; Danu, M.; Păslaru, E.; Rusu, D.; Tuchilus, C.G.; Macocinschi, D. Formulation and Evaluation of Anise-Based Bioadhesive Vaginal Gels. *Biomed. Pharm.* **2016**, *83*, 485–495. [\[CrossRef\]](#)
27. Zimmermann, E.S.; Ferreira, L.M.; Denardi, L.B.; Sari, M.H.M.; Cervi, V.F.; Nogueira, C.W.; Alves, S.H.; Cruz, L. Mucoadhesive Gellan Gum Hydrogel Containing Diphenyl Diselenide-Loaded Nanocapsules Presents Improved Anti-Candida Action in a Mouse Model of Vulvovaginal Candidiasis. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2021**, *167*, 106011. [\[CrossRef\]](#)
28. Su, J.; Ma, J.; Mo, F.; Yang, X.; Zhang, P.; Zhang, J. Thermosensitive Hydrogels as a Controlled Release System for Alkannin to Improve Localized Treatment of Candida Vaginitis after External Beam Radiotherapy in Vitro and in Vivo. *Pathog. Dis.* **2019**, *77*, ftz041. [\[CrossRef\]](#)
29. Arpa, M.D.; Yoltas, A.; Onay Tarlan, E.; Şenyüz, C.S.; Sipahi, H.; Aydın, A.; Üstündağ, N. New Therapeutic System Based on Hydrogels for Vaginal Candidiasis Management: Formulation-Characterization and in Vitro Evaluation Based on Vaginal Irritation and Direct Contact Test. *Pharm. Dev. Technol.* **2020**, *25*, 1238–1248. [\[CrossRef\]](#)
30. Neoh, C.F.; Leung, L.; Misra, A.; Vajpayee, R.B.; Davies, G.E.; Fullinwaj, R.O.; Stewart, K.; Kong, D.C.M. Penetration of Topically Administered 0.5-Percent Caspofungin Eye Drops into Human Aqueous Humor. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2011**, *55*, 761–763. [\[CrossRef\]](#)
31. Chatterjee, S.; Hui, P.C. leung. Review of Stimuli-Responsive Polymers in Drug Delivery and Textile Application. *Molecules* **2019**, *24*, 2547. [\[CrossRef\]](#)
32. Peak, C.W.; Wilker, J.J.; Schmidt, G. A Review on Tough and Sticky Hydrogels. *Colloid Polym. Sci.* **2013**, *291*, 2031–2047. [\[CrossRef\]](#)
33. Islam, M.; Park, T.-E.; Reesor, E.; Cherukula, K.; Hasan, A.; Firdous, J.; Singh, B.; Kang, S.-K.; Choi, Y.-J.; Park, I.-K.; et al. Mucoadhesive Chitosan Derivatives as Novel Drug Carriers. *Curr. Pharm. Des.* **2015**, *21*, 4285–4309. [\[CrossRef\]](#)
34. Jiménez-Gómez, C.P.; Cecilia, J.A. Chitosan: A Natural Biopolymer with a Wide and Varied Range of Applications. *Molecules* **2020**, *25*, 3981. [\[CrossRef\]](#)
35. Sahariah, P.; Másson, M. Antimicrobial Chitosan and Chitosan Derivatives: A Review of the Structure-Activity Relationship. *Biomacromolecules* **2017**, *18*, 3846–3868. [\[CrossRef\]](#)
36. Liu, L.; Gao, Q.; Lu, X.; Zhou, H. In Situ Forming Hydrogels Based on Chitosan for Drug Delivery and Tissue Regeneration. *Asian J. Pharm. Sci.* **2016**, *11*, 673–683. [\[CrossRef\]](#)

37. Rizwan, M.; Yahya, R.; Hassan, A.; Yar, M.; Azzahari, A.D.; Selvanathan, V.; Sonsudin, F.; Abouloula, C.N. PH Sensitive Hydrogels in Drug Delivery: Brief History, Properties, Swelling, and Release Mechanism, Material Selection and Applications. *Polymers* **2017**, *9*, 137. [[CrossRef](#)]
38. Antunes, F.E.; Gentile, L.; Rossi, C.O.; Tavano, L.; Ranieri, G.A. Gels of Pluronic F127 and Nonionic Surfactants from Rheological Characterization to Controlled Drug Permeation. *Colloids Surf. B Biointerfaces* **2011**, *87*, 42–48. [[CrossRef](#)]
39. Frank, L.A.; Sandri, G.; D'Autilia, F.; Contri, R.V.; Bonferoni, M.C.; Caramella, C.; Frank, A.G.; Pohlmann, A.R.; Guterres, S.S. Chitosan Gel Containing Polymeric Nanocapsules: A New Formulation for Vaginal Drug Delivery. *Int. J. Nanomed.* **2014**, *9*, 3151–3161.
40. Jalalvandi, E.; Shavandi, A. In Situ-Forming and PH-Responsive Hydrogel Based on Chitosan for Vaginal Delivery of Therapeutic Agents. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **2018**, *29*, 158. [[CrossRef](#)]
41. Yang, T.T.; Cheng, Y.Z.; Qin, M.; Wang, Y.H.; Yu, H.L.; Wang, A.L.; Zhang, W.F. Thermosensitive Chitosan Hydrogels Containing Polymeric Microspheres for Vaginal Drug Delivery. *Biomed. Res. Int.* **2017**, *2017*, 3564060. [[CrossRef](#)]
42. Patil, M.V.; Jadhav, R.L.; Shaikh, S.N.; Belhekar, S.N. Formulation and Evaluation Thermoreversible Gel of Antifungal Agent for Treatment of Vaginal Infection. *J. Pharm. Res. Int.* **2020**, *32*, 58–66. [[CrossRef](#)]
43. Wang, X.; Wang, J.; Wu, W.; Li, H. Vaginal Delivery of Carboplatin-Loaded Thermosensitive Hydrogel to Prevent Local Cervical Cancer Recurrence in Mice. *Drug Deliv.* **2016**, *23*, 3544–3551. [[CrossRef](#)]
44. Vasile, C.; Pamfil, D.; Stoleru, E.; Baican, M. New Developments in Medical Applications of Hybrid Hydrogels Containing Natural Polymers. *Molecules* **2020**, *25*, 1539. [[CrossRef](#)]
45. Chen, Y.; Lee, J.H.; Meng, M.; Cui, N.; Dai, C.Y.; Jia, Q.; Lee, E.S.; Jiang, H.B. An Overview on Thermosensitive Oral Gel Based on Poloxamer 407. *Materials* **2021**, *14*, 4522. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Malli, S.; Bories, C.; Pradines, B.; Loiseau, P.M.; Ponchel, G.; Bouchemal, K. In Situ Forming Pluronic® F127/Chitosan Hydsrogel Limits Metronidazole Transmucosal Absorption. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2017**, *112*, 143–147. [[CrossRef](#)]
47. Park, K.M.; Woo Bae, J.; Joung, Y.K.; Shin, J.W.; Park, K.D. Nanoaggregate of Thermosensitive Chitosan-Pluronic for Sutained Release of Hydrophobic Drug. *Colloids Surf. B Biointerfaces* **2008**, *63*, 1–6. [[CrossRef](#)]
48. Yoo, H.S. Photo-Cross-Linkable and Thermo-Responsive Hydrogels Containing Chitosan and Pluronic for Sustained Release of Human Growth Hormone (HGH). *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* **2007**, *18*, 1429–1441. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
49. Argenta, D.F.; Bernardo, B.D.C.; Chamorro, A.F.; Matos, P.R.; Caon, T. Thermosensitive Hydrogels for Vaginal Delivery of Secnidazole as an Approach to Overcome the Systemic Side-Effects of Oral Preparations. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2021**, *159*, 105722. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
50. Falavigna, M.; Pattacini, M.; Wibel, R.; Sonvico, F.; Škalko-Basnet, N.; Flaten, G.E. The Vaginal-PVPA: A Vaginal Mucosa Mimicking in Vitro Permeation Tool for Evaluation of Mucoadhesive Formulations. *Pharmaceutics* **2020**, *12*, 568. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
51. Chatterjee, S.; Hui, P.C.-L.; Kan, C.-W.; Wang, W. Dual-Responsive (PH/Temperature) Pluronic F-127 Hydrogel Drug Delivery System for Textile-Based Transdermal Therapy. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 11658. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. Wang, W.Y.; Hui, P.C.L.; Wat, E.; Ng, F.S.F.; Kan, C.W.; Lau, C.B.S.; Leung, P.C. Enhanced Transdermal Permeability via Constructing the Porous Structure of Poloxamer-Based Hydrogel. *Polymers* **2016**, *8*, 406. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Shaarani, S.; Hamid, S.S.; Kaus, N.H.M. The Influence of Pluronic F68 and F127 Nanocarrier on Physicochemical Properties, in Vitro Release, and Antiproliferative Activity of Thymoquinone Drug. *Pharmacogn. Res.* **2017**, *9*, 12–20.
54. Berenguer, D.; Alcover, M.M.; Sessa, M.; Halbaut, L.; Guillén, C.; Boix-montañés, A.; Fisa, R.; Calpena-campmany, A.C.; Riera, C.; Sosa, L. Topical Amphotericin B Semisolid Dosage Form for Cutaneous Leishmaniasis: Physicochemical Characterization, Ex Vivo Skin Permeation and Biological Activity. *Pharmaceutics* **2020**, *12*, 149. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

55. Chejara, D.R.; Kondaveeti, S.; Prasad, K.; Siddhanta, A.K. Studies on the Structure–Property Relationship of Sodium Alginate Based Thixotropic Hydrogels. *RSC Adv.* **2013**, *3*, 15744–15751. [\[CrossRef\]](#)
56. Liu, Y.; Yang, F.; Feng, L.; Yang, L.; Chen, L.; Wei, G.; Lu, W. In Vivo Retention of Poloxamer-Based in Situ Hydrogels for Vaginal Application in Mouse and Rat Models. *Acta Pharm. Sin. B* **2017**, *7*, 502–509. [\[CrossRef\]](#)
57. Sanz, R.; Clares, B.; Mallandrich, M.; Suñer-Carbó, J.; Montes, M.J.; Calpena, A.C. Development of a Mucoadhesive Delivery System for Control Release of Doxepin with Application in Vaginal Pain Relief Associated with Gynecological Surgery. *Int. J. Pharm.* **2018**, *535*, 393–401. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
58. Acosta, N.; Sánchez, E.; Calderón, L.; Cordoba-Diaz, M.; Cordoba-Diaz, D.; Dom, S.; Heras, A. Physical Stability Studies of Semi-Solid Formulations from Natural Compounds Loaded with Chitosan Microspheres. *Mar. Drugs* **2015**, *13*, 5901–5919. [\[CrossRef\]](#)
59. Giuliano, E.; Paolino, D.; Fresta, M.; Cosco, D. Mucosal Applications of Poloxamer 407-Based Hydrogels: An Overview. *Pharmaceutics* **2018**, *10*, 159. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
60. Bansal, M.; Mittal, N.; Yadav, S.K.; Khan, G.; Gupta, P.; Mishra, B.; Nath, G. Periodontal Thermoresponsive, Mucoadhesive Dual Antimicrobial Loaded in-Situ Gel for the Treatment of Periodontal Disease: Preparation, in-Vitro Characterization and Antimicrobial Study. *J. Oral Biol. Craniofacial Res.* **2018**, *8*, 126–133. [\[CrossRef\]](#)
61. Desai, P.R.; Jain, N.J.; Sharma, R.K.; Bahadur, P. Effect of Additives on the Micellization of PEO/PPO/PEO Block Copolymer F127 in Aqueous Solution. *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* **2001**, *178*, 57–69. [\[CrossRef\]](#)
62. Brugués, A.P.; Naveros, B.C.; Campmany, A.C.C.; Pastor, P.H.; Saladrigas, R.F.; Lizandra, C.R. Developing Cutaneous Applications of Paromomycin Entrapped in Stimuli-Sensitive Block Copolymer Nanogel Dispersions. *Nanomedicine* **2015**, *10*, 227–240. [\[CrossRef\]](#)
63. Gosecka, M.; Gosecki, M. Antimicrobial Polymer-Based Hydrogels for the Intravaginal Therapies-Engineering Considerations. *Pharmaceutics* **2021**, *13*, 1393. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
64. Takeuchi, H.; Thongborisute, J.; Matsui, Y.; Sugihara, H.; Yamamoto, H.; Kawashima, Y. Novel Mucoadhesion Tests for Polymers and Polymer-Coated Particles to Design Optimal Mucoadhesive Drug Delivery Systems. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2005**, *57*, 1583–1594. [\[CrossRef\]](#)
65. Saikia, C.; Gogoi, P. Chitosan: A Promising Biopolymer in Drug Delivery Applications. *J. Mol. Genet. Med.* **2015**, *s4*, 899–910. [\[CrossRef\]](#)
66. Domínguez-Delgado, C.L.; Fuentes-Prado, E.; Escobar-Chávez, J.J.; Vidal-Romero, G.; Rodríguez-Cruz, I.M.; Díaz-Torres, R. Chitosan and Pluronic® F-127: Pharmaceutical Applications. *Encycl. Biomed. Polym. Polym. Biomater.* **2016**, *2016*, 1513–1535.
67. Zhou, Y.; Cheng, L.; Lei, Y.L.; Ren, B.; Zhou, X. The Interactions Between Candida Albicans and Mucosal Immunity. *Front. Microbiol.* **2021**, *12*, 652725. [\[CrossRef\]](#)
68. Muilwijk, E.W.; Schouten, J.A.; van Leeuwen, H.J.; van Zanten, A.R.H.; de Lange, D.W.; Colbers, A.; Verweij, P.E.; Burger, D.M.; Pickkers, P.; Brüggemann, R.J.M. Pharmacokinetics of Caspofungin in ICU Patients. *J. Antimicrob. Chemother.* **2014**, *69*, 3294–3299. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
69. Moor, A.B.-D.; Sysiak-Sławecka, J.; Rypulak, E.; Borys, M.; Piwowarczyk, P.; Raszewski, G.; Onichimowski, D.; Czuczwar, M.; Wiczling, P. Nonstationary Pharmacokinetics of Caspofungin in ICU Patients. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2020**, *64*, e00345-20.
70. Gustot, T.; Heine, R.T.; Brauns, E.; Cotton, F.; Jacobs, F.; Brüggemann, R.J. Caspofungin Dosage Adjustments Are Not Required for Patients with Child-Pugh B or C Cirrhosis. *J. Antimicrob. Chemother.* **2018**, *73*, 2493–2496. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
71. Dodane, V.; Khan, M.A.; Merwin, J.R. Effect of Chitosan on Epithelial Permeability and Structure. *Int. J. Pharm.* **1999**, *182*, 21–32. [\[CrossRef\]](#)
72. Dumortier, G.; Grossiord, J.L.; Agnely, F.; Chaumeil, J.C. A Review of Poloxamer 407 Pharmaceutical and Pharmacological Characteristics. *Pharm. Res.* **2006**, *23*, 2709–2728. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
73. Bodratti, A.M.; Alexandridis, P. Formulation of Poloxamers for Drug Delivery. *J. Funct. Biomater.* **2018**, *9*, 11. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

74. Katz, D.F.; Yuan, A.; Gao, Y. Vaginal Drug Distribution Modeling. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2015**, *92*, 2–13. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
75. Ensign, L.M.; Tang, B.C.; Wang, Y.Y.; Tse, T.A.; Hoen, T.; Cone, R.; Hanes, J. Mucus-Penetrating Nanoparticles for Vaginal Drug Delivery Protect against Herpes Simplex Virus. *Sci. Transl. Med.* **2012**, *4*, 138ra79. [[CrossRef](#)]
76. Raafat, D.; Sahl, H.G. Chitosan and Its Antimicrobial Potential—a Critical Literature Survey. *Microb. Biotechnol.* **2009**, *2*, 186–201. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
77. Raafat, D.; Von Bargen, K.; Haas, A.; Sahl, H.G. Insights into the Mode of Action of Chitosan as an Antibacterial Compound. *Appl. Environ. Microbiol.* **2008**, *74*, 3764–3773. [[CrossRef](#)]
78. Abilova, G.K.; Kaldybekov, D.B.; Irmukhametova, G.S.; Kazybayeva, D.S.; Iskakbayeva, Z.A.; Kudaibergenov, S.E.; Khutoryanskiy, V.V. Chitosan/Poly(2-Ethyl-2-Oxazoline) Films with Ciprofloxacin for Application in Vaginal Drug Delivery. *Materials* **2020**, *13*, 1709. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
79. Amores, S.; Domenech, J.; Colom, H.; Calpena, A.C.; Clares, B.; Gimeno, Á.; Lauroba, J. An Improved Cryopreservation Method for Porcine Buccal Mucosa in Ex Vivo Drug Permeation Studies Using Franz Diffusion Cells. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2014**, *60*, 49–54. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
80. Aka-Any-Grah, A.; Bouchemal, K.; Koffi, A.; Agnely, F.; Zhang, M.; Djabourov, M.; Ponchel, G. Formulation of Mucoadhesive Vaginal Hydrogels Insensitive to Dilution with Vaginal Fluids. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2010**, *76*, 296–303. [[CrossRef](#)]
81. Schramm, G.; Electron, T. A Practical Approach to Rheology and Rheometry. In *Thermo Haake, Karlsruhe*, 2nd ed.; GebruederHAAKE GmbH: Karlsruhe, Germany, 2004.
82. El Moussaoui, S.; Fernández-Campos, F.; Alonso, C.; Limón, D.; Halbaut, L.; Garduño-Ramirez, M.L.; Calpena, A.C.; Mallandrich, M. Topical Mucoadhesive Alginate-Based Hydrogel Loading Ketorolac for Pain Management after Pharmacotherapy, Ablation, or Surgical Removal in Condyloma Acuminata. *Gels* **2021**, *7*, 8. [[CrossRef](#)]
83. Soriano-Ruiz, J.L.; Calpena-Campmany, A.C.; Silva-Abreu, M.; Halbout-Bellowa, L.; Bozal-de Febrer, N.; Rodríguez-Lagunas, M.J.; Clares-Naveros, B. Design and Evaluation of a Multifunctional Thermosensitive Poloxamer-Chitosan-Hyaluronic Acid Gel for the Treatment of Skin Burns. *Int. J. Biol. Macromol.* **2020**, *142*, 412–422. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
84. Gonzalez-Pizarro, R.; Carvajal-Vidal, P.; Bellowa, L.H.; Calpena, A.C.; Espina, M.; García, M.L. In-Situ Forming Gels Containing Fluorometholone-Loaded Polymeric Nanoparticles for Ocular Inflammatory Conditions. *Colloids Surf. B Biointerfaces* **2019**, *175*, 365–374. [[CrossRef](#)]
85. Abdellatif, M.M.; Khalil, I.A.; Elakkad, Y.E.; Eliwa, H.A.; Samir, T.M.; Al-Mokaddem, A.K. Formulation and Characterization of Sertaconazole Nitrate Mucoadhesive Liposomes for Vaginal Candidiasis. *Int. J. Nanomed.* **2020**, *15*, 4079–4090. [[CrossRef](#)]
86. Bauer, A.W.; Kirby, W.M.; Sherris, J.C.; Turck, M. Antibiotic Susceptibility Testing by a Standardized Single Disk Method. *Am. J. Clin. Pathol.* **1966**, *45*, 493–496. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
87. Clinical and Laboratory Standard Institute. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests, 11th ed. CLSI Publication Document M02-A11. 2012, Volume 32. Available online: <https://www.nih.org.pk/wp-content/uploads/2021/02/CLSI-2020.pdf> (accessed on 12 December 2021).

Artículo 4

Gel Formulations with an Echinocandin for Cutaneous Candidiasis: The Influence of Azone and Transcutol on Biopharmaceutical Features

«Formulaciones en gel con una equinocandina para la candidiasis cutánea:
Influencia de la Azona y el Transcutol en las características
biofarmacéuticas»

Noelia Pérez-González, Lupe Carolina Espinoza, María Rincón,
Lilian Sosa, Mireia Mallandrich, Joaquim Suñer-Carbó, Nuria
Bozal-de Febrer, Ana Cristina Calpena, Beatriz Clares-Naveros

Gels

2023, 9(4), 308

<https://doi.org/10.3390/gels9040308>

eISSN	2310-2861
Editorial	MDPI (Multidisciplinary Digital Publishing Institute)
Factor de impacto	5,0
Categoría	Polymer Science
Special Issue	Hydrogel for Sustained Delivery of Therapeutic Agents
Posición	15/95
Cuartil	Q1

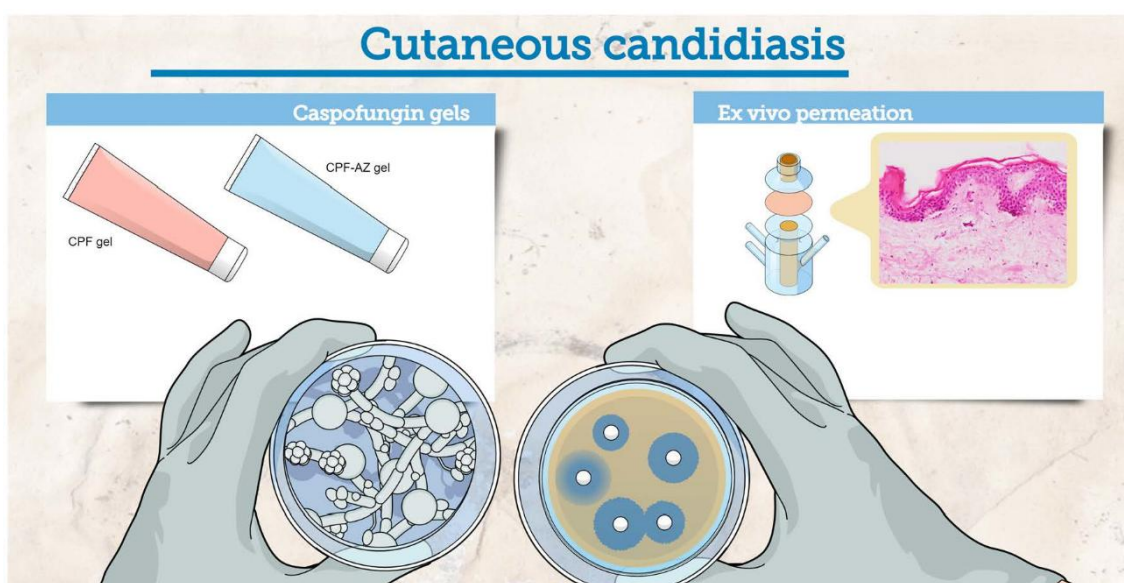
Resumen

La caspofungina (CPF) es un fármaco utilizado para infecciones fúngicas difíciles de tratar, incluyendo aspergilosis invasiva, candidemia y otras formas de candidiasis invasiva. El objetivo de este estudio fue incorporar Azona y Transcutol en un gel de CPF (CPF-AZ-gel) y compararlo con un gel de CPF sin promotores (CPF-gel). Se realizaron estudios de liberación *in vitro* utilizando una membrana de politetrafluoroetileno y permeación *ex vivo* en piel humana. Las propiedades de tolerancia se confirmaron mediante análisis histológico, y se evaluaron las propiedades biomecánicas de la piel.

Se determinó la eficacia antimicrobiana frente a *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* y *Candida tropicalis*. Se obtuvieron formulaciones de CPF-AZ-gel y CPF-gel con apariencia homogénea, comportamiento pseudoplástico y alta extensibilidad. Los estudios biofarmacéuticos confirmaron que la CPF se liberó siguiendo un modelo de asociación exponencial de una fase o de liberación de primer orden, observándose una mayor liberación en el CPF-AZ-gel. Este último mostró una mayor retención del fármaco en la piel, mientras limitaba su difusión hacia el fluido receptor.

Ambas formulaciones fueron bien toleradas tanto en las secciones histológicas como tras su aplicación tópica en la piel. Las formulaciones inhibieron el crecimiento de *C. glabrata*, *C. parapsilosis* y *C. tropicalis*, mientras que *C. albicans* mostró resistencia. En resumen, el tratamiento dérmico con CPF podría ser una terapia prometedora para la candidiasis cutánea en pacientes refractarios o intolerantes a los agentes antifúngicos convencionales.

Graphical abstract



Gel Formulations with an Echinocandin for Cutaneous Candidiasis: The Influence of Azone and Transcutol on Biopharmaceutical Features

Noelia Pérez-González¹, Lupe Carolina Espinoza², María Rincón^{3,4}, Lilian Sosa⁵, Mireia Mallandrich^{4,6,*}, Joaquim Suñer-Carbó^{4,6}, Nuria Bozal-de Febrer⁷, Ana Cristina Calpena^{4,6}, Beatriz Clares-Naveros and Beatriz Clares-Naveros^{1,4,8}

¹ Department of Pharmacy and Pharmaceutical Technology, Faculty of Pharmacy, University Campus of Cartuja, University of Granada, 18071 Granada, Spain

² Departamento de Química, Universidad Técnica Particular de Loja, Loja 1101608, Ecuador

³ Departament de Ciència de Materials i Química Física, Facultat de Química, Universitat de Barcelona (UB), C. Martí i Franquès 1-11, 08028 Barcelona, Spain

⁴ Institut de Nanociència i Nanotecnologia (IN2UB), Universitat de Barcelona (UB), 08028 Barcelona, Spain

⁵ Pharmaceutical Technology Research Group, Faculty of Chemical Sciences and Pharmacy, National Autonomous University of Honduras (UNAH), Tegucigalpa 11101, Honduras

⁶ Departament de Farmàcia, Tecnologia Farmacèutica, i Fisicoquímica, Facultat de Farmàcia i Ciències de l'Alimentació, Universitat de Barcelona (UB), 08028 Barcelona, Spain

⁷ Departament de Biologia, Sanitat i Medi Ambient, Facultat de Farmàcia i Ciències de l'Alimentació, Universitat de Barcelona (UB), 08028 Barcelona, Spain

⁸ Biosanitary Institute of Granada (ibs.GRANADA), 18012 Granada, Spain

* Correspondence: mireia.mallandrich@ub.edu

Abstract

Caspofungin is a drug that is used for fungal infections that are difficult to treat, including invasive aspergillosis and candidemia, as well as other forms of invasive candidiasis. The aim of this study was to incorporate Azone in a caspofungin gel (CPF-AZ-gel) and compare it with a promoter-free caspofungin gel (CPF-gel). An *in vitro* release study using a polytetrafluoroethylene membrane and *ex vivo* permeation into human skin was adopted. The tolerability properties were confirmed by histological analysis, and an evaluation of the biomechanical properties of the skin was undertaken. Antimicrobial efficacy was determined against *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis*, and *Candida tropicalis*. CPF-AZ-gel and CPF-gel, which had a homogeneous appearance, pseudoplastic behavior, and high spreadability, were obtained. The biopharmaceutical studies confirmed that caspofungin was released following a one-phase exponential association model and the CPF-AZ gel showed a higher release. The CPF-AZ gel showed higher retention of caspofungin in the skin while limiting the diffusion of the drug to the receptor fluid. Both formulations were well-tolerated in the histological sections, as well as after their topical application in the skin. These formulations inhibited the growth of *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, and *C. tropicalis*, while *C. albicans* showed resistance. In summary, dermal treatment with caspofungin could be used as a promising therapy for cutaneous candidiasis in patients that are refractory or intolerant to conventional antifungal agents.

Keywords: caspofungin; echinocandin; Azone; candidiasis; permeation enhancer; gel

1. Introduction

Candidiasis is a fungal infection caused by the yeast of the genera *Candida* spp., which is the most important cause of opportunistic mycoses worldwide and can proliferate in the skin and mucosal surface, even causing a systemic infection [1,2]. *Candida albicans* is the most prevalent pathogen that is responsible for about 70% of fungal infections [2].

Cutaneous candidiasis is caused by *Candida* proliferation in the skin, mainly in the intertriginous areas, producing inflammation, dryness, erosions, and pustules [3,4]. Despite the available pharmacological treatments, such as azoles and polyenes, complications from *Candida* infections are frequent, especially in patients that are refractory or intolerant to these antifungal drugs or those in hospital conditions, including immunosuppressed populations such as patients with malignancies or HIV infections for whom the mortality rates are high [4,5].

Therefore, the treatment of candidiasis becomes a challenge in this population, and consequently, other pharmacological options, such as echinocandins, have been addressed [6]. Echinocandin drugs are formed by a cyclic nucleus composed of several amino acid residues and N-linked acyl lipophilic fatty acid tails, which act as an anchor for the drug at the pathogen cell wall. These antifungal drugs inhibit the biosynthesis of β -(1,3)-D-glucan, which is present in the fungal cell walls, including in *Aspergillus* and *Candida* spp. [5,7,8]. Currently, there are some clinically used echinocandins, such as caspofungin, micafungin, and anidulafungin, all of which have a lipopeptide structure that is synthetically modified from the fermentation broths of different fungi [8]. Caspofungin is a semi-synthetic lipopeptide obtained from a fermentation product of *Glarea lozoyensis* [9]; its chemical structure is depicted in Figure 1. In 2001, caspofungin was approved by the US Food and Drug Administration (FDA) and the European Medicines Agency (EMA). This drug is used as therapy for fungal infections that are difficult to treat, including invasive aspergillosis, as well as candidemia and other forms of invasive candidiasis [6,10]. However, caspofungin is only used for intravenous administration due to its high molecular weight (1093.31 g/mol) and poor oral bioavailability, and consequently, the need arises to investigate alternative formulations and routes of administration to improve the efficacy of the drug and facilitate its use [9]. Dermal treatment with caspofungin could be used as a promising therapy for cutaneous candidiasis in patients that are refractory or intolerant to conventional antifungal agents.

In recent years, formulations combining polymers have been designed to produce multifunctional gels [11]. The combination of polymers of a natural origin, such as chitosan, with polymers of a synthetic origin, such as poloxamer 407, produces gels with a bio-compatible and biodegradable nature, with a high permeability capacity and, thus, better therapeutic effect [12]. Chitosan is a cationic polysaccharide consisting of glucosamine and N-acetylglucosamine units obtained by the alkaline deacetylation of the natural polysaccharide chitin and is known for its antimicrobial properties. It is biocompatible, biodegradable, and capable of forming gels *in situ* with negatively charged macromolecules [13–15]. On the other hand, poloxamer 407 is a hydrophilic nonionic surfactant consisting of a hydrophobic polypropylene oxide (PPO) core block flanked by hydrophilic poly (ethylene oxide) (PEO-PPO-PEO) blocks and is known to be thermoreversible [16]. To that end, skin penetration promoters can be used in order to facilitate the drug permeation through the stratum corneum and achieve an effective drug concentration [17]. Several permeation enhancers, including pyrrolidones, Azone, alcohols, sulfoxides, surfactants, essential oils, and their chemical constituents, have been proposed in cosmetic and pharmaceutical formulations to improve transdermal drug delivery and increase drug retention in the skin [18,19]. The ideal purpose of these permeation enhancers should be to temporarily and reversibly perturb the barrier function of the stratum corneum [19]. The reported mechanisms of action for these skin penetration promoters include the (i) reversible alteration of the intercellular lipid matrix or on the intracellular keratin domains, (ii) changes in the drug/tissue partition

coefficient, and (iii) the disturbance of skin metabolism [20]. Azone (1-dodecylazacycloheptan-2-one) was the first synthetic compound specifically designed as a skin permeation promoter [21]. The chemical structure of Azone (Figure 1) shows a polar headgroup (within a seven-membered ring) attached to a C12 chain, which possibly allows this molecule to interact directly with the skin lipid domains to disturb the organized lipid packing [19,22]. Transcutol-P (diethylene glycol monoethyl ether) is a compound that is extensively used as a penetration enhancer in topical delivery systems, as well as for its solubilizing action [23–26]; Figure 1 depicts its chemical structure.

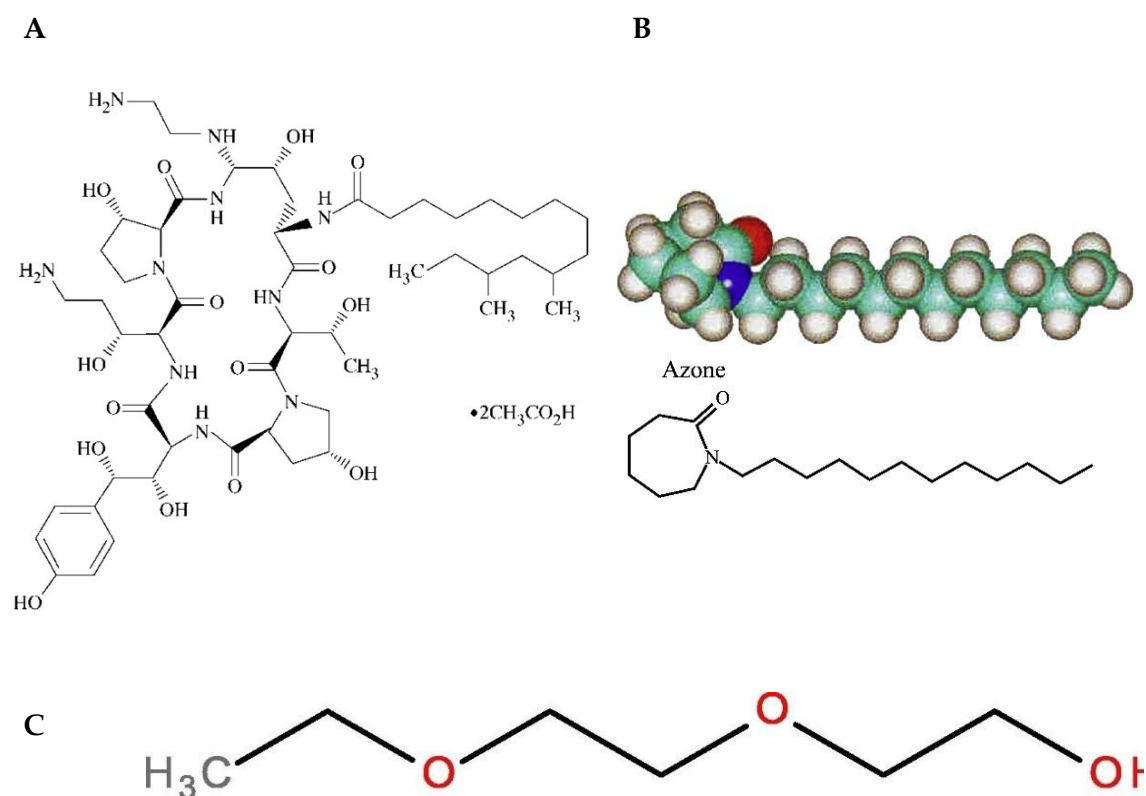


Figure 1. Chemical structure of drug and skin promoters. (A) Caspofungin [27], (B) Azone [20], and (C) diethylene glycol monoethyl ether (Transcutol) [28].

Considering these remarkable findings, the aim of the study was to design and develop a topical delivery system for caspofungin. Two formulations were developed: a caspofungin gel (CPF-gel) and a caspofungin gel with the addition of two promoters: Azone and Transcutol-P (CPF-AZ-gel). The physicochemical, biopharmaceutical, and efficacy properties of both formulations in the treatment of cutaneous candidiasis were compared. Figure 2 illustrates a schematic representation of the development and evaluation of the hydrogels composed of pluronic F-127 and chitosan, with and without permeation enhancers loading caspofungin.

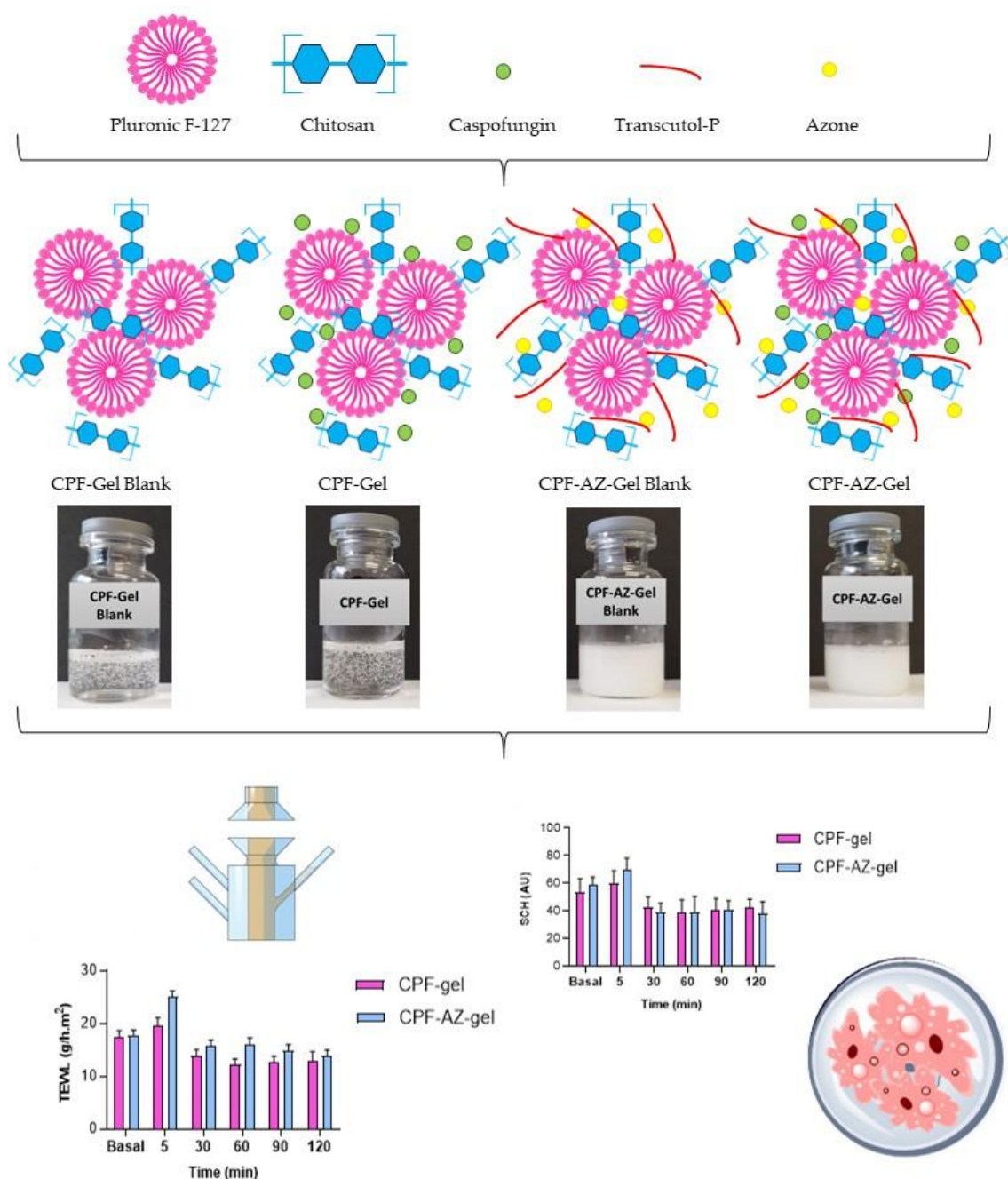


Figure 2. Schematic representation of the development of the loaded and unloaded hydrogels composed of pluronic F-127 and chitosan, with and without permeation enhancers, and the evaluation of the formulations.

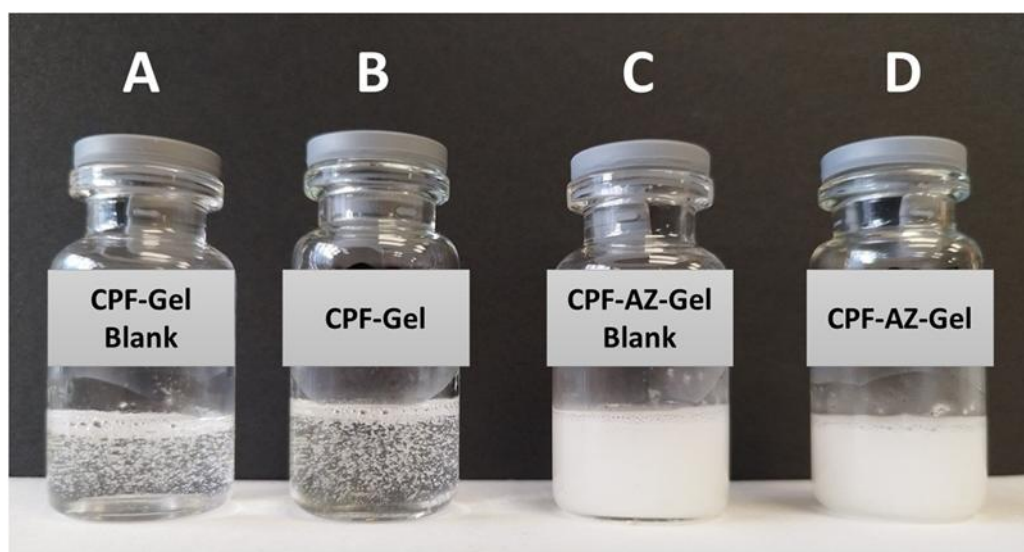
2. Results and Discussion

2.1. Preparation of Gel Formulations

The composition of CPF-gel and CPF-AZ-gel obtained in this work are described in Table 1. CPF-gel was obtained by dissolving Pluronic F-127 (18%) and caspofungin (2%) in cold water (58%), then chitosan (2%) that was previously dissolved in 0.1 M aqueous acid acetic solution (20%) was added. On the other hand, CPF-AZ-gel was obtained by incorporating a mixture of Azone (5%) and Transcutol-P (5%) into CPF-gel that was previously prepared by considering water adjustment. Both gels (CPF-gel and CPF-AZ-gel) had a uniform and homogeneous appearance, free of visible particles, lumps, and precipitates (Figure 3).

Table 1. Composition formula of caspofungin-loaded gels.

Ingredients	CPF-gel (% w/w)	CPF-AZ-gel (% w/w)
Caspofungin	2	2
Chitosan	2	2
Pluronic F-127	18	18
0.1 M Acid acetic solution	20	20
Water	58	48
Azone	-	5
Transcutol-P	-	5

**Figure 3.** Photograph of drug-loaded hydrogels and nondrug-loaded hydrogels. (A) CPF-Gel without drug; (B) CPF-Gel; (C) CPF-AZ-Gel without drug, and (D) CPF-AZ-Gel.

The gelling of CPF-gel and CPF-AZ-gel occurs because of the Pluronic F-127 and chitosan content. In an aqueous solution, the amphiphilic properties of Pluronic F-127 cause self-aggregation-forming micelles at concentrations above its critical micelle concentration, where PPO hydrophobic groups interact together via van der Waals forces to form the inner core, whereas the PEO hydrophilic groups interact with water molecules via hydrogen bonds to form the outer shell [29,30]. Consequently, gelation occurs at sufficient concentrations of Pluronic F-127, which, in this study, was 18% due to micelles packing [31]. On the other hand, the gelling with chitosan was produced by physical cross-linking, where ion interactions and hydrogen bonds are the driving forces for the formation of the entangled networks of this gel [32,33]. Figure 4 illustrates the mechanism of hydrogel formation.

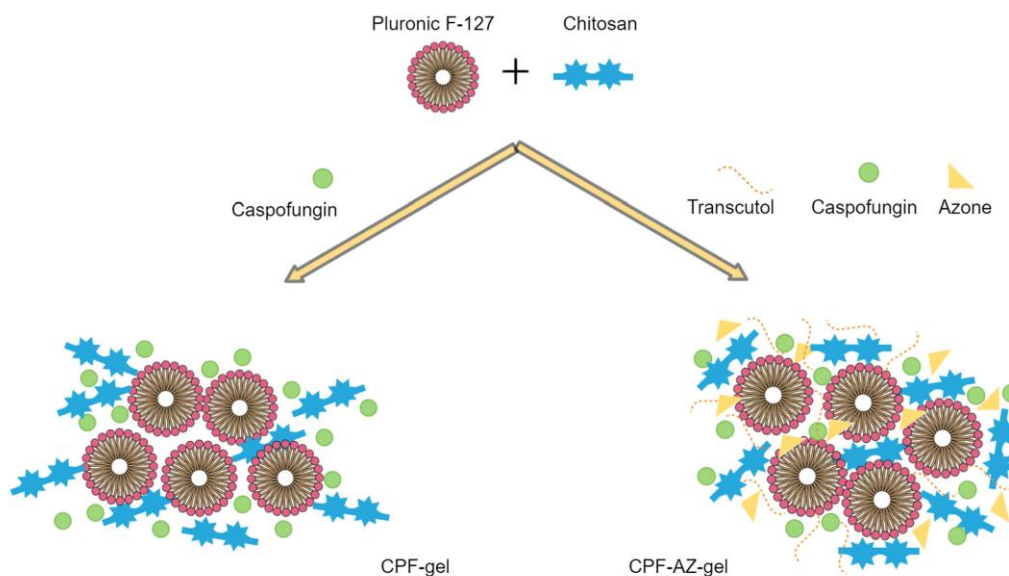


Figure 4. Schematic illustration of the mechanism of hydrogel formation.

2.2. Thermosensitive Properties

The incorporation of the drug into the hydrogels did not change the temperature sensitivity, as shown in Figure 5. No significant differences were observed when the gels were acclimatized to the different temperatures after the addition of the Azone and Transcutol-P promoters. As the temperature increased, the gels seemed to flow better. However, at no time was the gelation state reached.

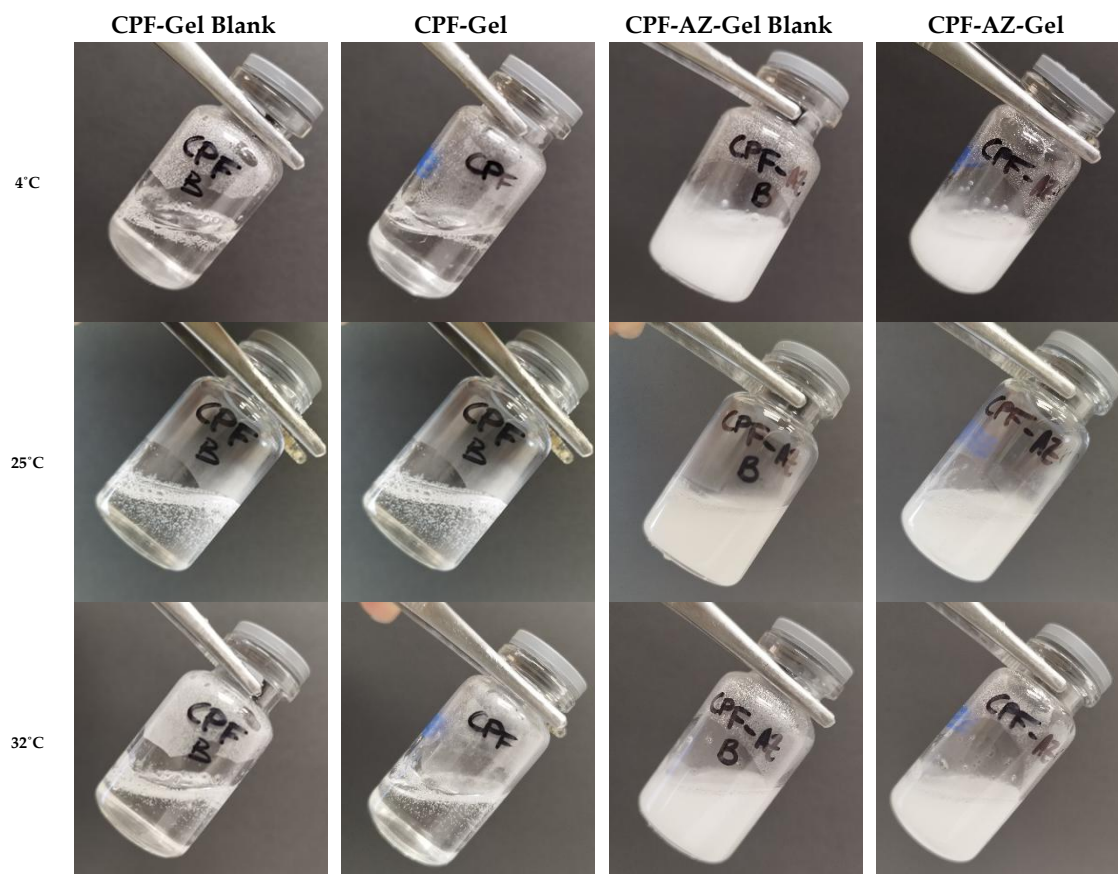


Figure 5. Physical appearance of the hydrogels at different temperatures: 4°C, 25°C, and 32°C.

Combinations of polymers, such as CTS and P407, can modify the properties of the resulting system. The micellar corona increases in thickness because the number of hydrophilic chains increases. This is due to the interaction between CTS and the polyethylene oxide chains of P407. As a result of the interaction, the apparent viscosity increases, leading to a decrease in temperature, whereby the SOL-GEL transition could be reached [34,35].

2.3. Fourier Transform Infrared

Fourier transform infrared (FTIR) was performed to investigate any possible interaction between the drug and the gel matrix. Figure 6 shows the FTIR spectra for the loaded and unloaded gels of CPF-gel and CPF-AZ-gel. The peaks corresponding to different functional groups of caspofungin can be seen at about 1600 cm^{-1} : carbonyl and amide. Within the range $3200\text{--}3600\text{ cm}^{-1}$, there are peaks related to O-H bond vibrations from the alcohol groups present in the structure, as well as from the amide groups (Figure 6c). When analyzing the hydrogels loaded with caspofungin, a remarkable decrease in the absorption is observed within the range $3000\text{--}3600\text{ cm}^{-1}$ (OH stretching) compared to the caspofungin spectrum. This fact indicates that caspofungin interacts with the hydrogel via the hydrogen bonds, especially between the hydroxyl groups in both caspofungin and the polymers.

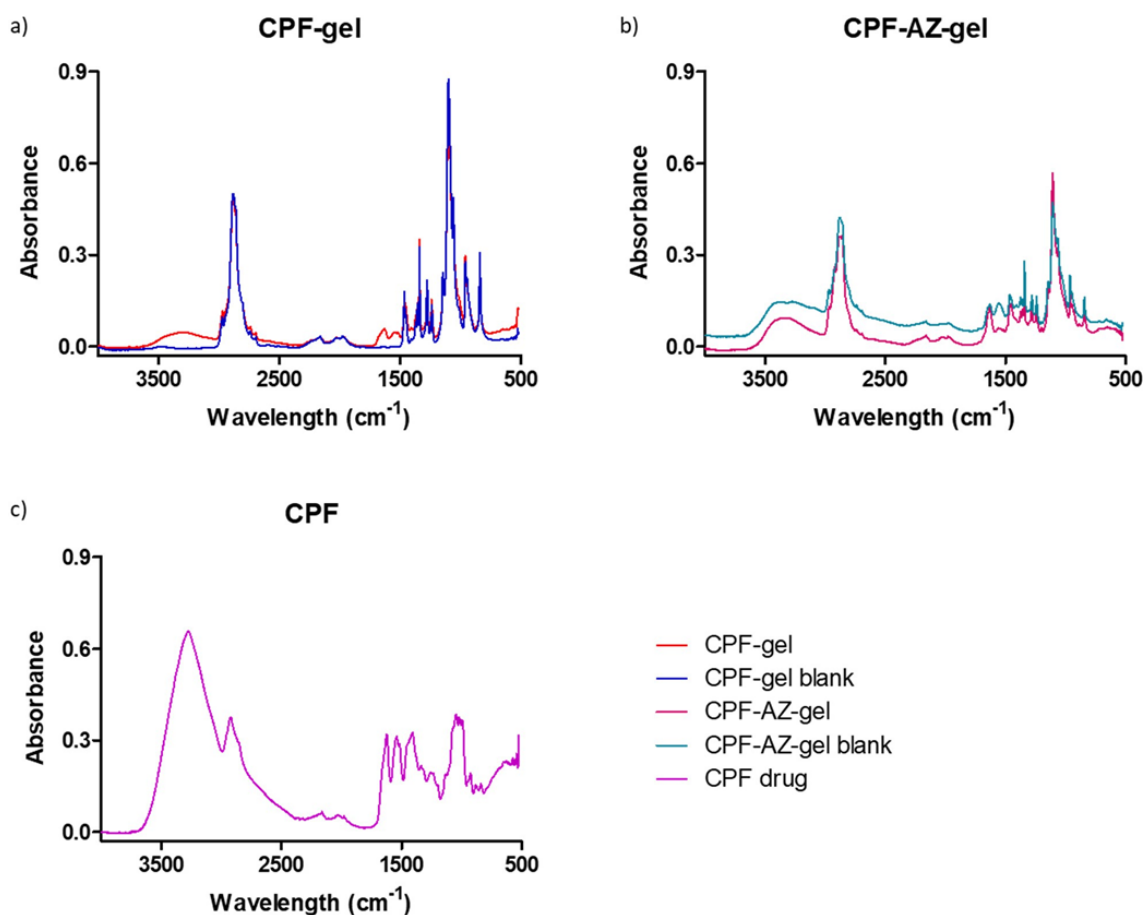


Figure 6. FTIR spectra for the gels: (a) CPF gel (red) and placebo (blue), (b) CPF-AZ-gel (pink) and placebo (cyan), and (c) caspofungin acetate salt Sun-Pharma (purple).

2.4. Morphological Study and Determination of the Porosity of the Hydrogels

The structure of the gels was evaluated via scanning electron microscopy (SEM) after desiccating the gels. Figure 7 shows the SEM images of the unloaded and loaded hydrogels. CPF-

gel showed a denser and more compact structure than CPF-AZ-gel. The addition of Transcutol-P and Azone resulted in a more rounded shape structure, which was especially remarkable for the unloaded gels.

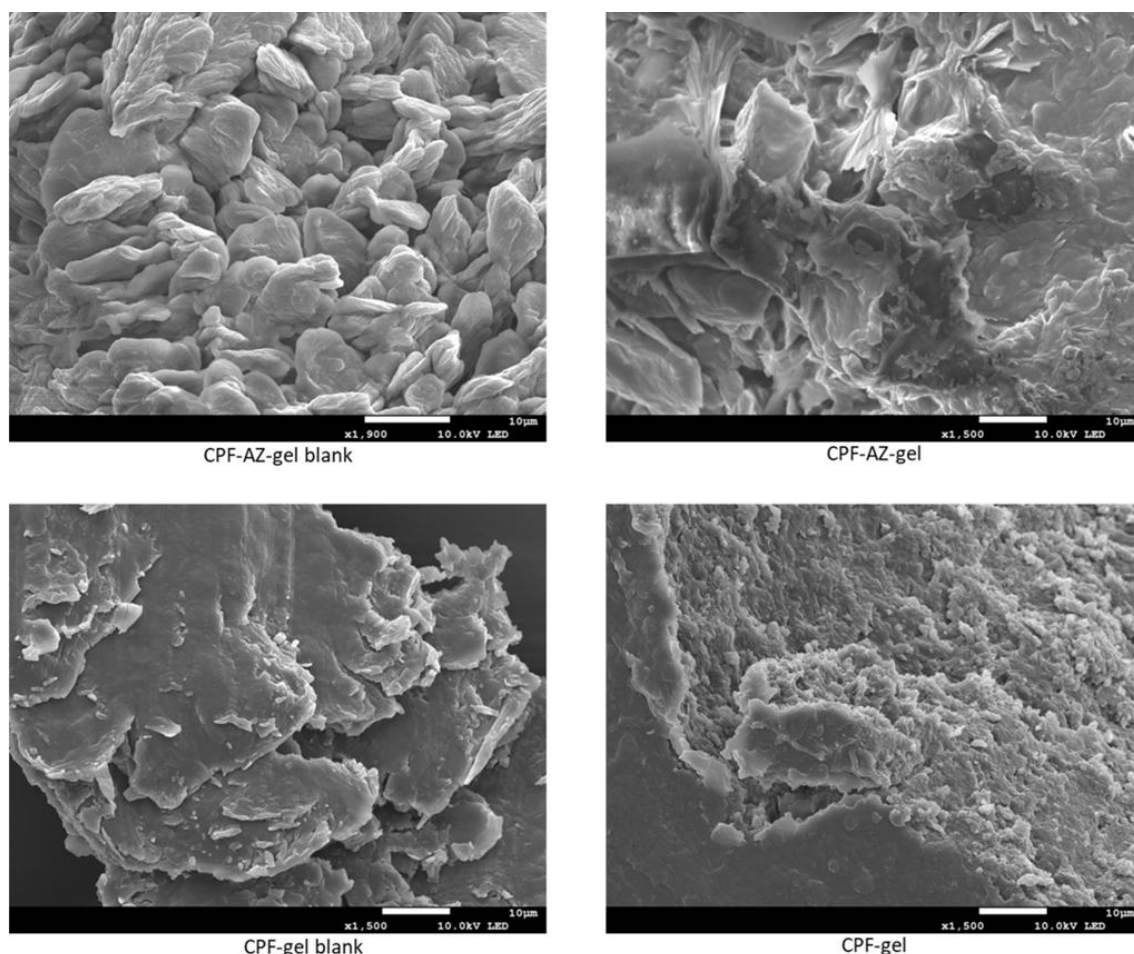


Figure 7. SEM images of the hydrogels: left panels show the blank hydrogels with or without permeation enhancers, and the right panels display the loaded hydrogels.

Hydrogels have the capacity to absorb large amounts of water or biological fluids; when the gels absorb more than 10 times their weight (in the dried state), they are classified as superabsorbent hydrogels. There are different techniques to evaluate gel porosity; in this work, the porosity was determined by the density of the solvent uptake. CPF-AZ-gel showed higher porosity than CPF-gel (Table 2). The addition of Transcutol-P and Azone in the hydrogel increased the porosity by about four-fold. The porosity of the gels has an impact on the drug release from the gel matrix [36]. This is in line with the drug release behavior observed in Section 2.7; CPF-AZ-gel released greater amounts of caspofungin than CPF-gel.

Table 2. Porosity of caspofungin-loaded gels.

Formulation	Porosity (%)
CPF-gel	5.7 ± 0.3
CPF-AZ-gel	22.4 ± 1.4

2.5. Rheological Behavior

Figure 8 shows the rheograms of CPF-gel and CPF-AZ-gel at 10, 25, and 32°C. Rheological behavior plays a critical role in topical formulations, as it determines sensory and dosage characteristics, as well as modulates the biopharmaceutical parameters, such as the drug release rate from its vehicle [37]. CPF-AZ-gel exhibited a higher viscosity than CPF-gel due to its Azone and Transcutol-P content, providing greater consistency to the final product. The viscosity of both formulations decreased as the temperature increased, showing values of 1.48, 1.16, and 0.95 Pa·s at 10, 25, and 32°C, respectively, for CPF-gel and 1.66, 1.52, and 1.09 Pa·s at 10, 25, and 32°C, respectively, for CPF-AZ-gel.

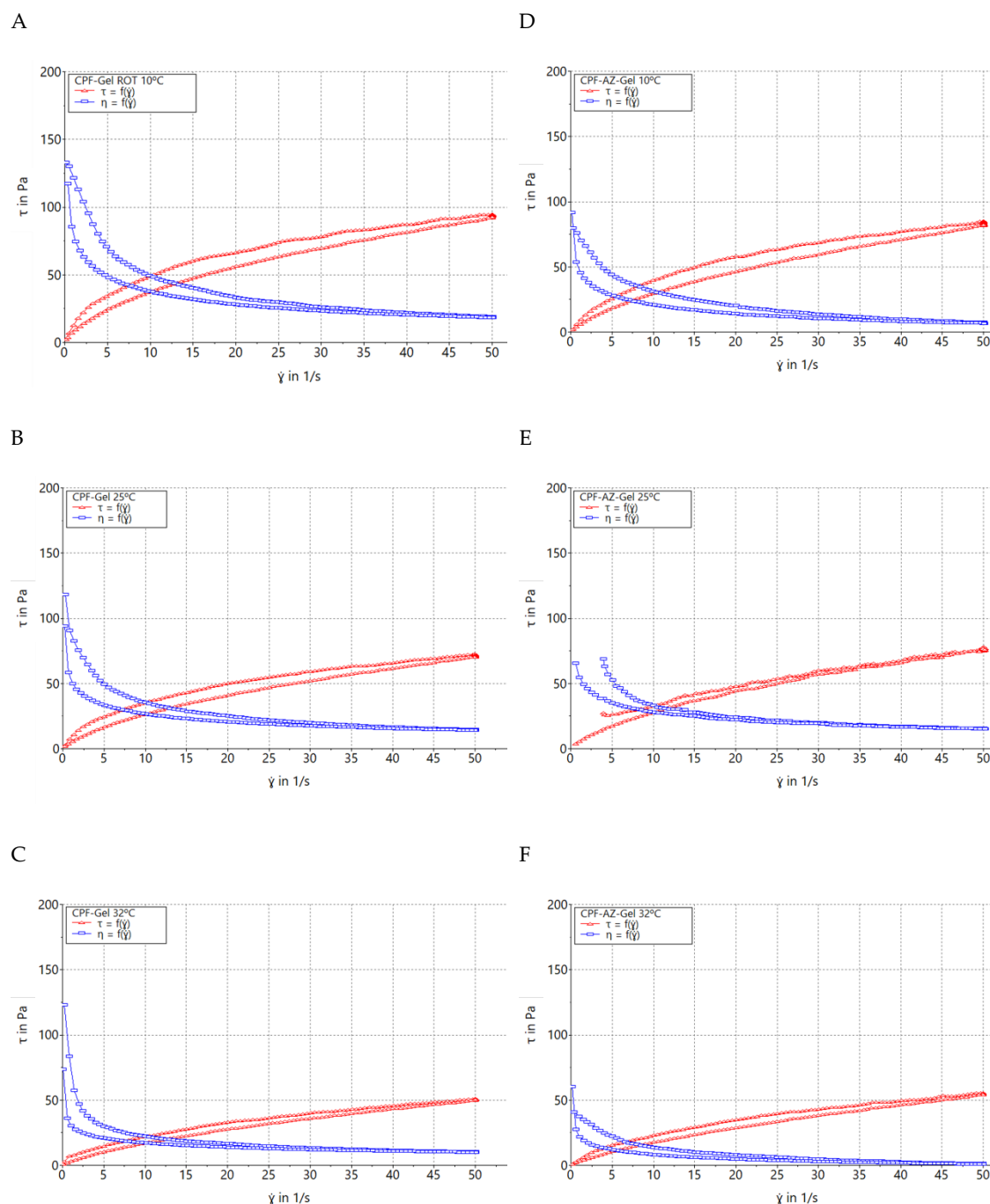


Figure 8. Rheograms of caspofungin formulations. (A) CPF-gel at 10°C, (B) CPF-gel at 25°C, (C) CPF-gel at 32°C, (D) CPF-AZ-gel at 10°C, (E) CPF-AZ-gel at 25°C, and (F) CPF-AZ-gel at 32°C.

Table 3 summarizes the results obtained from the rheological analysis of both formulations and the mathematical modeling of the experimental data. Both CPF-gel and CPF-AZ-gel at 10, 25, and 32°C exhibit shear-thinning (pseudoplastic) behavior, according to the Cross model for the stretch ramp-up and stretch ramp-down. This behavior is characterized by a decrease in viscosity as friction or light massage is applied to the treated area facilitating its spreadability on the skin; however, when the friction is stopped, the viscosity of the product returns to its original state, favoring the product residence time [38].

Table 3. Viscosity and mathematical fitting of caspofungin formulations at 10, 25 and 32°C.

Temperature conditions		10°C	25°C	32°C
CPF-gel	Viscosity (Pa·s) at 100 s ⁻¹	1.48 ± 0.01	1.16 ± 0.01	0.95 ± 0.03
	Mathematical model (stretch ramp up/down)	Cross	Cross	Cross
CPF-AZ-gel	Viscosity (Pa·s) at 100 s ⁻¹	1.66 ± 0.02	1.52 ± 0.01	1.09 ± 0.01
	Mathematical model (stretch ramp up/down)	Cross	Cross	Cross

2.6. Spreadability Analysis

Sample spreading properties represent decisive parameters in the assessment of topical forms as they affect the process of incorporation into the container as well as the uniformity of the dose and application, thereby affecting therapeutic efficacy [39,40]. CPF-gel and CPF-AZ-gel followed a hyperbola one-site model (Figure 9), and similar values were observed regarding the extensibility of the two formulas (Table 4). The results obtained indicate that both formulas can be easily spread on the skin.

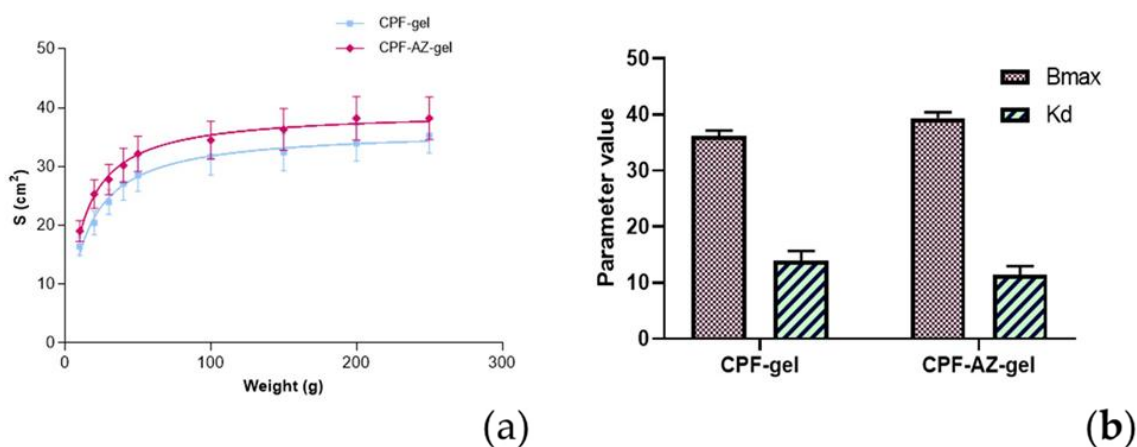


Figure 9. Evaluation of the spreadability of CPF-gel and CPF-AZ-gel, fitting a one-site hyperbola equation: (a) Spreading area (S, cm²) as a function of the applied mass (g) at 22 ± 2°C; 60 ± 5% RH, and (b) plot of the parameters of the formulas of CPF-gel, and CPF-AZ-gel fitting a one-site hyperbola equation. The data are expressed as the mean ± standard deviation (SD) of the three replicates (*n* = 3).

2.7. Evaluation of the Drug-Release Kinetics

The amount of caspofungin that was released from the formulations was assessed by *in vitro* release tests performed by Franz cells. A suitable receptor medium for the *in vitro* drug release studies must provide sink conditions so as to ensure that the concentration of the drug in the receiver compartment will not exceed 30% of the concentration to the saturation of the given drug in that medium [41]. Keeping sink conditions is crucial and prevents the inhibition of drug diffusion through the membrane/skin due to the saturation of the medium [42]. In this study, 0.9% physiological saline solution provided the sink conditions for the study.

Table 4. Fitting and goodness of fit for the parameters estimated according to one-site hyperbola equations for the formulas CPF-gel and CPF-AZ-gel.

One site binding (hyperbola)	CPF-gel	CPF-AZ-gel
Best-fit values		
B _{max}	36.23	39.41
K _d	13.98	11.50
Std. Error		
B _{max}	0.9566	1.008
K _d	1.719	1.500
95% CI (profile likelihood)		
B _{max}	34.29 to 38.29	37.37 to 41.57
K _d	10.67 to 17.92	8.612 to 14.92
Goodness of Fit		
Degrees of Freedom	25	25
R squared	0.8725	0.8480
Sum of Squares	142.0	176.0
Sy.x	2.383	2.653
AICc	51.86	57.66

Figure 10 shows the release profile of caspofungin using a polytetrafluoroethylene (PTFE) membrane. The selection of the membrane in the drug-release studies is also crucial since they must be inert and must not limit the drug release, nor can any binding between the drug and the membrane occur [41].

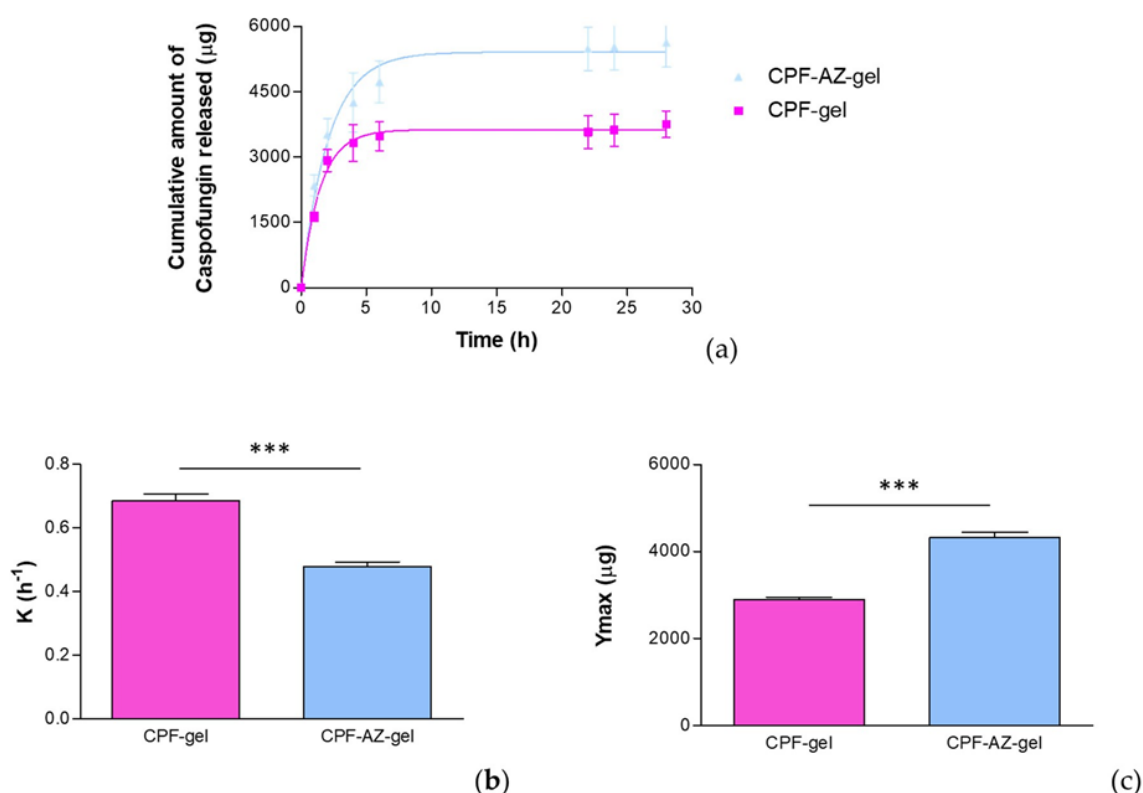


Figure 10. *In vitro* drug release of caspofungin from the CPF-gel and CPF-ZA-gel formulations: (a) release profile of caspofungin over time; (b) release constant (K), estimated by modeling to the best-fit model, corresponding to a one-phase exponential association model; (c) maximum amount released (Y_{max}) estimated by modeling to the best-fit model, corresponding to a one-phase exponential association model. ***significant statistical differences between the two gels (p < 0.0001).

The release data were fitted to the kinetic models to describe the release profile of caspofungin. The best fit was obtained for a one-phase exponential association model ($r^2 = 0.9986$ for CPF-gel and $r^2 = 0.9971$ for CPF-AZ-gel), for which the mathematical equation is

$$Y = Y_{max} \cdot (1 - e^{-K \cdot X}) \quad (1)$$

where K is the release rate, Y_{max} is the maximum amount of drug released, and X is the time. In this study, the parameters K and Y_{max} were estimated and statistically compared by a t-test. According to the one-phase exponential association kinetics, the release of caspofungin is directly proportional to the concentration of the drug remaining in the donor chamber, resulting in a fast drug release in the early stages when the concentration of the drug is high in the donor chamber, and followed by a slowing down of the release rate as the concentration in the donor chamber decreases

Although CPF-gel showed a greater release rate, it resulted in lower amounts of drug released than CPF-AZ-gel, which suggests that Azone and Transcutol-P improve the availability of the drug, and higher amounts of caspofungin would be delivered on the skin from the CPF-AZ-gel formulation.

2.8. Evaluation of the Permeation Capacity of Caspofungin through Ex Vivo Human Skin

The capacity of caspofungin to diffuse through the skin was evaluated by an *ex vivo* permeation study. In the *ex vivo* permeation studies, keeping sink conditions correct is as essential as in the *in vitro* drug release study. Furthermore, the receptor fluid, apart from providing sink conditions, must be biocompatible with the skin; for this reason, a 0.9% physiological saline solution was selected. Another important critical factor in permeation studies is the integrity of the *ex vivo* skin because using impaired skin or skin with altered barrier functions affects the permeability results. Hence, it is important to assess the skin integrity of the discs included in the study. Transepidermal water loss (TEWL) is one technique to evaluate skin integrity since there is a high correlation between TEWL values and skin integrity. Dey and co-workers investigated the TEWL values of intact skin, and then the researchers damaged the skin at different severities by removing stratum corneum with tape strips. They observed that the TEWL values for intact skin were below 13 g/m²/h; moderately compromised skin was prepared with 20 consecutive tape strips and showed TEWL values up to 15.6 g/m²/h; a total of 25–30 tape strips corresponded to highly compromised skin, for which the TEWL values increased up to 35 g/m²/h. The maximum damage was reached by separating the epidermis from the dermis with heat treatment; this extremely damaged skin resulted in TEWL values up to 44.8 g/m²/h [43]. The stratum corneum is the outermost layer of the skin and is the main factor responsible for the barrier function. Skins with altered barrier functions are usually more permeable than intact skins. For this reason, the integrity of the skin discs used in this study was considered, and only those with TEWL values below 13 g/m²/h were included in the study.

Figure 11 shows the amounts of caspofungin permeated over 28 h and those retained in the skin at the end of the experiment.

Similar amounts of caspofungin permeated through the human skin for most of the sampling time points; contrarily, the formulation CPF-AZ-gel led to a major drug retention within the skin at 28 h. This is probably due to the presence of Azone and Transcutol-P in the formulation. Azone is known to be a penetration enhancer that is useful for increasing the permeation of both hydrophilic and lipophilic drugs. Azone increases the fluidity of the skin lipids by disrupting the lipid bilayers of the skin [44]. Transcutol-P is widely used in topical and oral formulations to improve the solubility of poorly soluble drugs; it disrupts the stratum corneum of the skin [45,46].

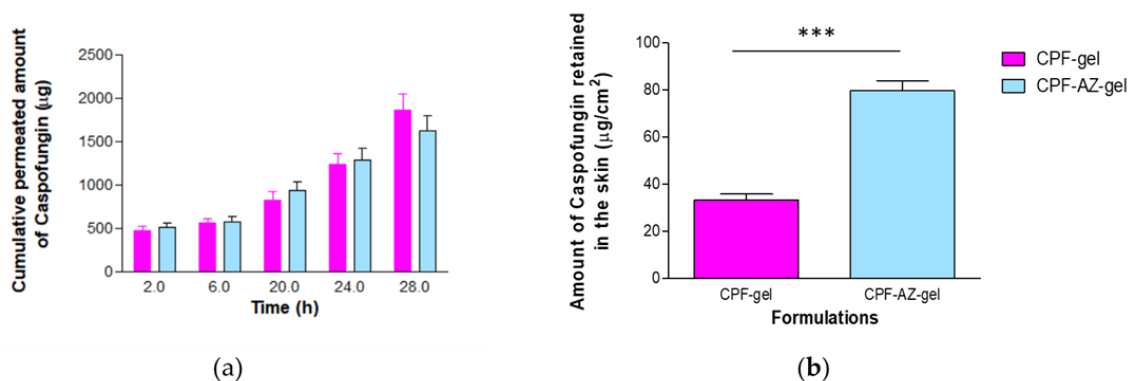


Figure 11. Permeation of caspofungin from CPF-gel and CPF-AZ-gel: (a) permeation profiles of caspofungin depicted as the cumulative amounts of caspofungin permeated through the *ex vivo* skin over time; (b) amount of caspofungin remaining in the skin at the end of the permeation study (28 h). *** significant statistical differences between the two gels ($p < 0.0001$).

The permeation parameters, such as the flux and the cumulative amount of drug permeated at a given time, characterize the rate and extent of the drug through the skin. Evaluating these parameters is important in the development and optimization of topical products. Table 5 reports typical permeation parameters.

Table 5. Permeation parameters estimated for CPF-gel and CPF-AZ-gel.

Parameter	CPF-gel	CPF-AZ-gel
A_{28h} (µg)	1854.4 ± 193.2	1623.9 ± 173.2
J (µg/h)	129.2 ± 14.7	86.9 ± 1.3 ***
J/cm^2 (µg/h/cm²)	50.8 ± 5.8	34.2 ± 0.5 ***
TI (h)	13.9 ± 1.2	9.2 ± 1.4 ***
K_p (10^{-3} cm/h)	2.54 ± 0.29	1.71 ± 0.02 ***
P_2 (10^{-2} 1/h)	1.20 ± 0.14	1.79 ± 0.11 ***
P_1 (10^{-2} cm)	21.23 ± 0.21	9.53 ± 0.02 ***
C_{ss} (ng/mL)	26.99 ± 3.08	18.16 ± 2.65 **

A_{28h} : cumulative amount of caspofungin permeated at 28h. J : flux; TI : lag-time; K_p : permeability coefficient; P_1 : partition coefficient vehicle-skin; P_2 : diffusion coefficient and C_{ss} : predicted plasma concentration at the steady state. ** statistical significance $p < 0.01$ and *** statistical significance $p < 0.0001$.

The amount of caspofungin that permeated through the skin over 28 h was slightly higher from the CPF-gel; however, no statistical differences were observed between the formulations for this parameter. The flux corresponds to the permeation rate of the drug through the skin, which is obtained as the slope of the linear regression of the linear part of the permeation profile; this parameter can also be expressed per unit area. The flux was 1.5-fold higher for CPF-gel, indicating that caspofungin crosses the skin faster when applied formulated in CPF-gel than CPF-AZ-gel. Apparently, the inclusion of Azone and Transcutol-P restricts the permeation of caspofungin and retains the drug in the skin. This is an interesting result for local therapy. The same pattern was observed for parameters TI and K_p , which were 1.5-fold higher for CPF-gel with respect to CPF-AZ-gel. A shorter lag time predicts an earlier onset of action; hence, it is expected that CPF-AZ-gel will initiate its therapeutical action more rapidly than CPF-gel. The permeability coefficient is greater for CPF-gel, which is logical because K_p is estimated from the flux, and CPF-gel exhibited a higher flux. The higher the permeability coefficient, the higher the permeation of the drug into the receptor fluid.

The permeation of drugs depends on both the partition and diffusion processes. When analyzing the partition and diffusion coefficients, it is evident that the partition has a greater impact on the permeation of caspofungin since it shows higher values than the diffusion coefficient. Interestingly, the addition of Azone and Transcutol-P increases the partition coefficient of caspofungin between the formulation and the skin with regard to the gel without the enhancers while decreasing the diffusion of caspofungin through the skin, resulting in a higher retention of caspofungin in the skin. This is also observed when analyzing the predicted plasma concentration at the steady state (C_{ss}); CPF-AZ-gel would reach a lower C_{ss} than CPF-gel. C_{ss} was estimated by taking into account the human plasma clearance for caspofungin (9.42 L/h) [19] and considering an application surface of 5 cm².

2.9. Histological Analysis of the Ex Vivo Human Skin after Permeation of Caspofungin

After the *ex vivo* permeation test, in which we evaluated the permeability capacity of caspofungin from the two gels, a histological analysis was carried out to assess whether any structural change on the skin occurred. Figure 12 shows the histological images of the formulations, as well as the positive and negative controls. The ethanol solution induced the loss of stratum corneum. CPF-gel and CPF-AZ-gel did not change the stratum corneum or the epithelium.

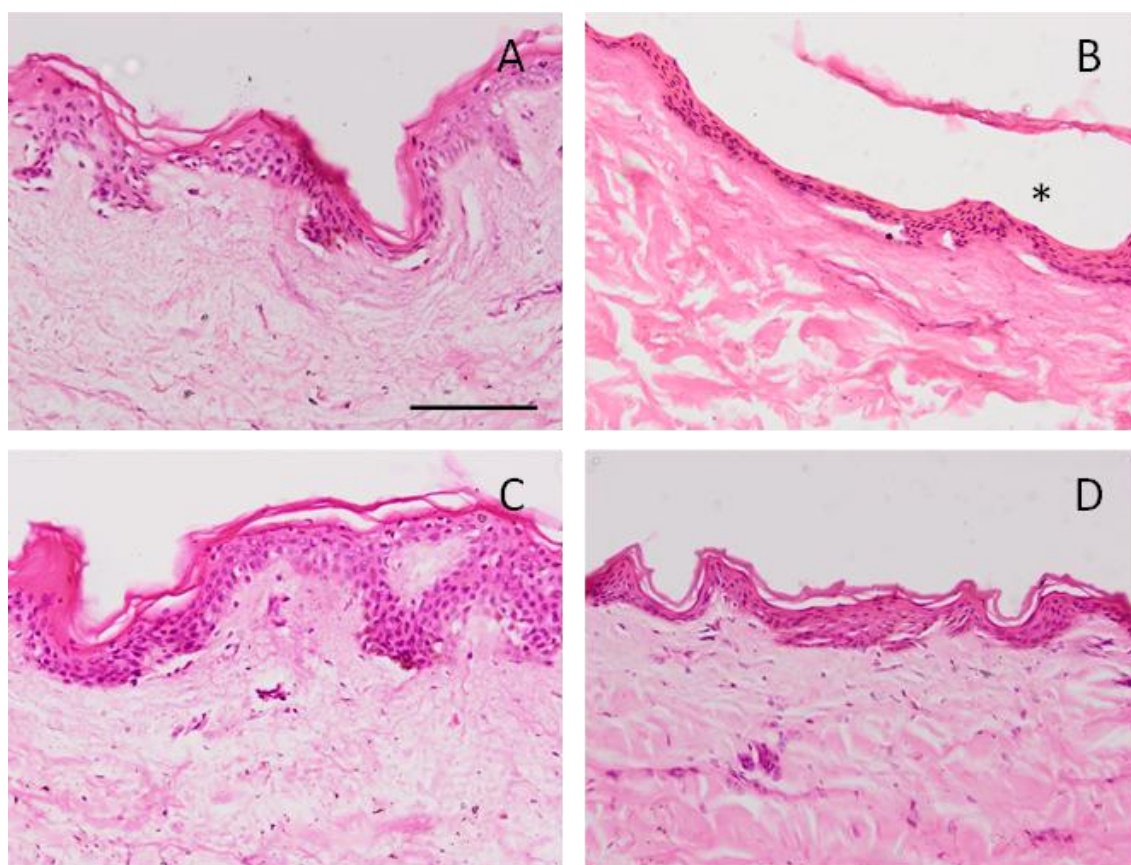


Figure 12. Skin sections stained with hematoxylin and eosin after the *ex vivo* permeation study, stained and observed under the microscope at 200X. Scale bar = 100 μ m. (A) PBS as negative control; (B) ethanol as positive control; (C) CPF-gel and (D) CPF-AZ-gel. Asterisk indicates loss of stratum corneum.

2.10. Tolerance Studies by Evaluating Biomechanical Skin Properties

The skin integrity indicates the state of the skin as a physical barrier that protects the body from the environment. The integrity of the skin can be evaluated by measuring TEWL, which

determines the ability of the skin to prevent water loss. TEWL increases when the skin barrier is compromised, for instance, via a cut, burn, or some skin diseases, including atopic dermatitis, eczema, or psoriasis. Altered skin barrier function, which may lead to increased transepidermal water loss, can result in irritation and skin dryness. Other factors can also impact the TEWL values, such as age and gender. For example, aging skin typically has a higher TEWL than younger skin, and exposure to dry or hot environments can increase TEWL.

Hence, measuring TEWL can be useful in dermatology and cosmetic science to evaluate the effectiveness of skin care products and treatments, as well as in clinical research to assess the skin barrier function in individuals with skin diseases or conditions [47].

Figure 13 shows the progression of the monitored parameters (TEWL and SCH) before and after the application of the formulations for up to 120 min. These parameters are indicative of the effect of the formulations on skin hydration and integrity. The transepidermal water loss (TEWL) values obtained from CPF-gel and CPF-AZ-gel showed a slight increase 5 min after the application and then a decrease at 30 min, and finally, remaining unchanged, being greater than the values for the formulation CPF-AZ-gel (Figure 13A, B, E). The stratum corneum hydration (SCH) values obtained from CPF-AZ-gel presented a slight increase 5 min after the application, with this increase being higher than the one for the CPF-gel formulation, and then this descended quickly; this occurs because the water in the formulas evaporates after 30 min and then both formulations remain unchanged, reaching values lower than the basal value (Figure 13C, D, F). Considering that skin hydration is directly related to skin capacitance, the results suggest that the formulations slightly increase hydration in relation to the normal behavior of the skin. No visible skin irritation was observed after the formulations were applied to the skin of the patients, indicating that both formulations were well tolerated on the skin.

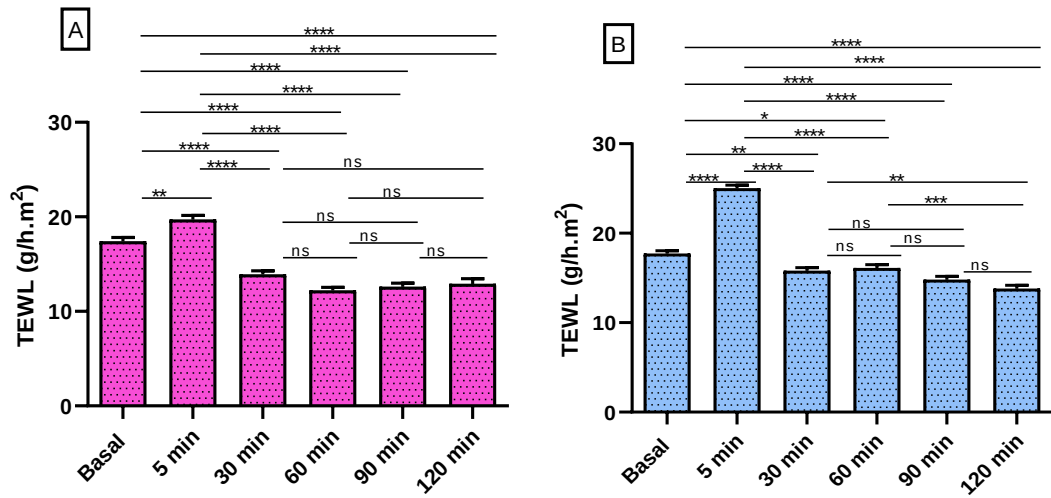


Figure 13. Cont.

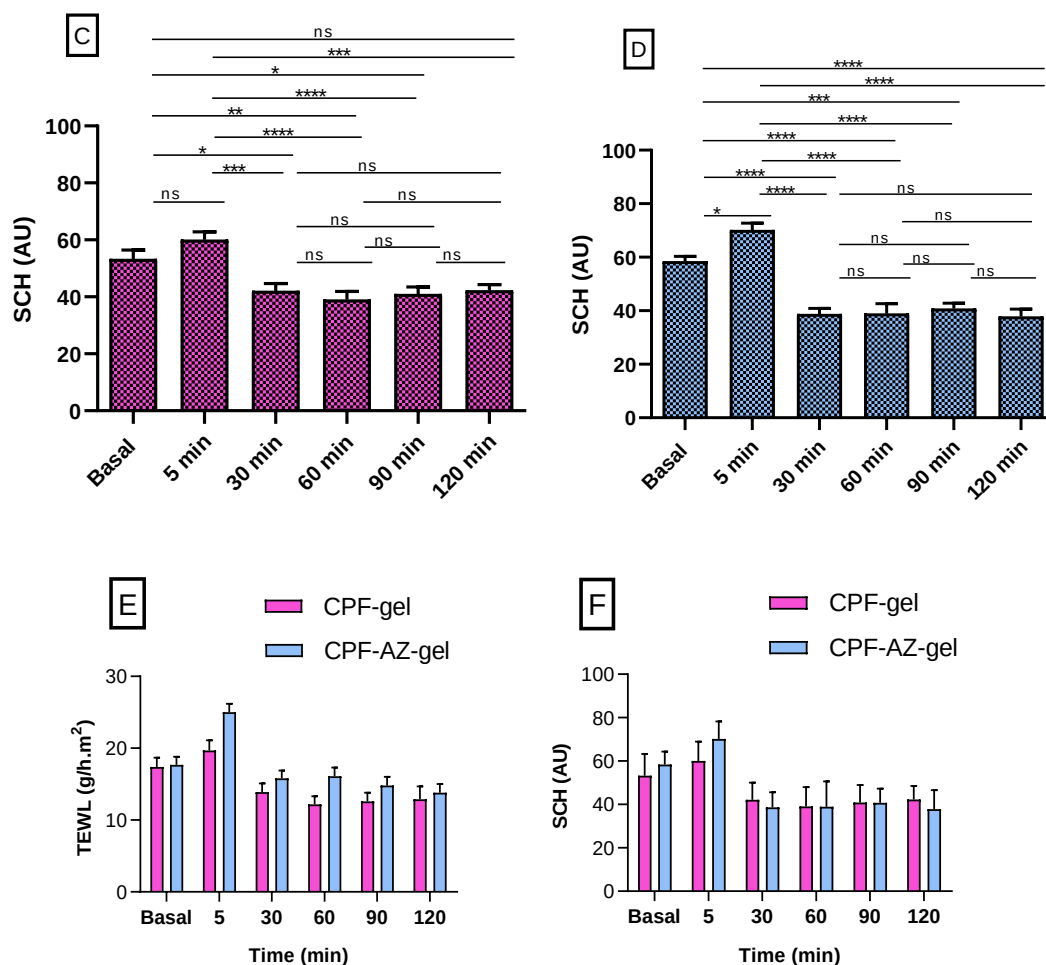


Figure 13. Biomechanical parameters evolution in human volunteers was monitored before the application of the formulations (basal) and 5 min, 30 min, 60 min, 90 min, and 120 min post-application. (A, B) TEWL of CPF-gel and CPF-AZ-gel, respectively, expressed as $\text{g/h} \times \text{m}^2$. (C, D) the SCH of CPF-gel and CPF-AZ-gel respectively expressed as arbitrary units (AU). Significant statistical differences: $*p < 0.05$, $**p < 0.01$, $***p < 0.001$, $****p < 0.0001$, ns = non-significant. (E) Comparison of the evolution of the TEWL between both formulas: CPF-gel and CPF-AZ-gel. (F) Comparison of the evolution of the SCH between both formulas: CPF-gel and CPF-AZ-gel. Each value represents the mean $\pm$ SD ($n = 10$).

2.11. Antimicrobial Efficacy

Caspofungin belongs to an essential class of antifungals, the echinocandins, which are used to treat invasive candidiasis that is resistant to conventional treatments. Candidiasis is caused mainly by *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, and *C. tropicalis* [48]. In this study, *in vitro* tests were carried out to determine if the *Candida* strains tested were susceptible to the formulations under investigation.

In this study, the CPF-gel and CPF-AZ-gel formulations demonstrated that they are effective at the *in vitro* level in three of the four *Candida* strains tested, producing broad areas of inhibition (Figure 14A–C, yellow circles), which indicates a beneficial effect since resistance to these types of drugs is gaining momentum over time, especially among isolates from immunosuppressed patients [49]. In the case of *C. albicans*, the growth of intrahalo colonies was observed within the zone of inhibition, showing resistance (orange arrow). This behavior has been observed in a previous study [39]. The gel without the drug produced a slight inhibitory effect in the area where the formulations were added.

This could be due to the impact caused by chitosan since the latter has been shown to have an antibacterial and antifungal effect (Figure 14A–C, blue circles) [50]. The results are summarized in Table 6.

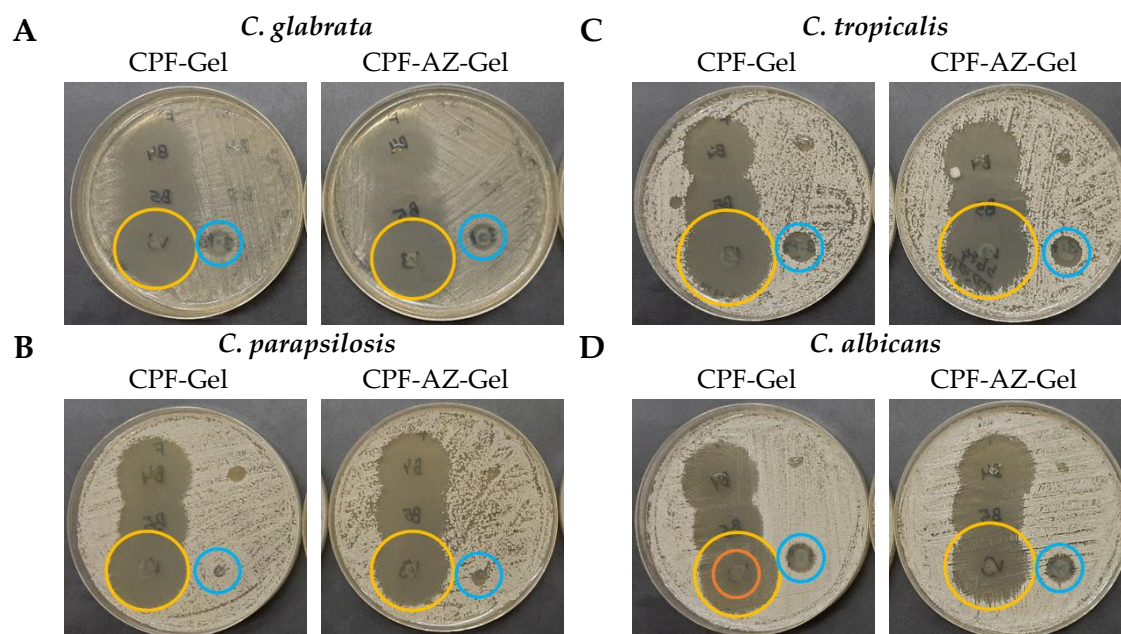


Figure 14. *In vitro* antifungal activity. (A) *C. glabrata* (B) *C. parapsilosis* (C) *C. tropicalis* and (D) *C. albicans*. The blue circles show the inhibition halo for CPF-gel and CPF-AZ-gel, the orange circles show the halo growth around the disc with an excipient (gel), and the yellow circles indicate the intrahalo growth of *C. albicans*.

Table 6. Growth inhibition on *Candida* species.

Yeast tested	CPF-gel	CPF-AZ-gel	Gel
<i>C. albicans</i>	R ^(a)	R ^(a)	R ^(b)
<i>C. glabrata</i>	S	S	R ^(b)
<i>C. parapsilosis</i>	S	S	R ^(b)
<i>C. tropicalis</i>	S	S	R ^(b)

S: susceptible, R^(a): resistant to inhibition of halo and intrahalo colonies, and R^(b): resistant, with the formation of a slight halo of inhibition.

3. Conclusions

Two gels containing caspofungin, which is an echinocandin antifungal, were prepared, CPF-gel and CPF-AZ-gel, with the latter containing Azone and Transcutol-P, which are penetration enhancers. The gels were analyzed for their viscosity and rheological behavior. The spreadability of the gels was also investigated, and all characteristics were suitable for topical administration.

The drug release profile from the gels and the capacity of caspofungin to diffuse through the skin were also evaluated. The release of caspofungin followed a one-phase exponential association model, showing CPF-AZ-gel to have a higher drug amount released. The gel containing Azone and Transcutol-P (CPF-AZ-gel) resulted in a higher retention of the caspofungin in the skin while limiting the diffusion of the drug to the receptor fluid. Hence, a higher amount of caspofungin is available in the skin for a local effect.

Both gels were well-tolerated since they did not show any damage to the skin in the histological study, nor was any irritation observed when the formulation was applied to the skin. A decrease in the TEWL values indicated that the gels did not alter the skin function barrier.

Finally, the antifungal activity was assessed on different *Candida* sp. The two gels inhibited the growth of *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, and *C. tropicalis*. However, *C. albicans* showed resistance.

In summary, the two gels showed satisfactory properties for a cutaneous application. Caspofungin was located in the skin, especially when applied through CPF-AZ-gel, through which it can exert a local effect. The formulations were well-tolerated, and the gels were effective against three of the four strains tested.

4. Materials and Methods

4.1. Materials

Caspofungin acetate salt (molecular weight ~1200 Da) was acquired from SunPharma (Barcelona, Spain). Poloxamer 407 (Pluronic F-127, molecular weight ~12,500 Da) was supplied by BASF (Barcelona, Spain), chitosan medium molecular weight (190–310 KDa and deacetylation degree $\geq 75\%$) was purchased from Sigma Aldrich (Madrid, Spain) and diethylene glycol monoethyl ether (Transcutol-P, molecular weight ~130 Da) was provided by Gattefossé (Saint-Priest, France). Azone (molecular weight ~280 Da) was acquired from Netqem (Durham, NC, USA), and acetic acid and reagents for the analytical method were acquired from Panreac (Barcelona, Spain). Purified and filtered water was obtained using a Milli-Q® Gradient A10 system apparatus (Millipore Iberica SAU.; Madrid, Spain).

4.2. Preparation of Gel Formulations

For CPF-gel preparation, Pluronic F-127 and caspofungin were dissolved using cold purified water at 4°C under magnetic stirring for 30 min, then chitosan previously dissolved in 0.1 M aqueous acetic acid solution was incorporated, maintaining stirring conditions for 20 min. For CPF-AZ-gel preparation, the water proportions of CPF-gel were adjusted to incorporate Azone previously mixed with Transcutol-P.

4.3. Thermosensitive Properties

In order to observe if there was a phase transition, the gels were acclimatized in vials at 4°C, 25°C, and 32°C. When the desired temperature was reached, the vials were inclined at approximately 45° to determine if the hydrogels flowed or not. The gels were photographed with and without the drug at different temperatures.

4.4. Fourier Transform Infrared

We investigated any possible chemical interaction between caspofungin and the polymers by Fourier Transform Infrared (FTIR). For this, the gels were desiccated in an oven at 37°C. The FTIR spectra were obtained by a Nicolet iZ10 (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) with a DTGS detector within the range of 4000–525 cm^{-1} with a spectral resolution of 4 cm^{-1} using attenuated total reflectance (ATR) with a diamond crystal. A total of 32 scans per spectrum were obtained.

4.5. Morphological Study and Determination of the Porosity of the Hydrogels

Scanning electron microscopy (SEM) was performed to investigate the gels' structure. To this end, the gels were desiccated in an oven at the temperature of 37°C, monitoring the desiccation process: the gels were weighed every day until a constant weight was observed. A

small amount of the dried gel was coated with a thin film of carbon to obtain a conductive sample suitable for observation by SEM JSM-7001F (JEOL, Inc, Peabody, MA, USA).

The porosity of the hydrogels (CPF-gel and CPF-AZ-gel) was determined by the density method. Briefly, weighed amounts of dried gels were placed in Eppendorf with 1 mL of pure ethanol ($n=3$ for each hydrogel). The experiment was conducted at 32°C.

At pre-established time points, the Eppendorfs were centrifuged at 3000 rpm for 3 min, the supernatants of ethanol were withdrawn by automated pipette, and the hydrogels were weighed to monitor the increase of weight, which corresponds to the ethanol uptake by the gel. The increase in weight was observed at different time points until a constant weight was obtained. The porosity was calculated according to Equation (2):

$$P = \frac{W_s - W_d}{\rho * V_s} * 100 \quad (2)$$

where W_d is the dried hydrogel's weight, W_s is the swollen hydrogel's weight, ρ is ethanol's density, and V_s is the volume of the swollen hydrogel determined by a pycnometer.

4.6. Rheological Behavior

Determining the rheological behaviour in topical products is essential in topical products because rheological properties are related to the consistency, texture and spreadability of the product. The viscosity of the formulation will impact the ease of application of the formulation to the skin. The rheological study was carried out with a Haake Rheostress 1® rheometer (Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe, Germany) using a cone-cone system (C60/2°Ti: 60 mm diameter, 2° angle). The shear stress (τ) and the viscosity (η) were determined as a function of the shear rate ($\dot{\gamma}$) at $25 \pm 0.1^\circ\text{C}$. The temperature was set with a thermostatic circulator Thermo Haake Phoenix II + Haake C25P. The Rotational measurements involved a 3-phase program which consisted of a ramp-up shear rate from 0 to 50 s^{-1} for 3 min, followed by a steady shear rate at 50 s^{-1} for 1 min and finally, a ramp-down from 50 to 0 s^{-1} for another period of 3 min. The viscosity was calculated at a steady shear at 100 s^{-1} .

The obtained data were analyzed with Data Manager v. 4.87 software (Haake Rheowin®, Thermo Electron Corporation, Karlsruhe, Germany) Data from the flow curves were modelled to different mathematical models [51]; and the best-fit model was selected on the basis of correlation coefficient and chi-square value.

4.7. Spreadability Analysis

Extensibility testing was carried out by placing a sample of 0.5 g of each formulation (CPF-gel and CPF-AZ-gel) between two glass plates, the one located in the bottom position pre-marked. The standard weight was added onto the upper plate for 60 s forcing the sample to spread. Nine pieces of increasing standard weight (10, 20, 30, 40, 50, 100, 150, 200, and 250 g) were added successively with 60 s between weights. The increase in the spreading area (diameter) was recorded as a function of the weight applied. The spreading area at each applied mass was calculated according to the following equation:

$$S = d^2 \times \frac{\pi}{4} \quad (3)$$

in which S is the spreading area (cm^2) calculated from the applied mass (g), and d is the mean diameter (cm) reached by the sample [39].

The formulations were analyzed in accordance with the best kinetic model, and the extensibility data were fitted to different mathematical equations (hyperbola, Boltzmann) using GraphPad Prism® version 8.0.0 for Windows, GraphPad Software, San Diego, CA, USA. The model fitting appropriateness was confirmed by the r value.

4.8. Evaluation of the Drug Release Kinetics

The rate and extent that caspofungin was released from the formulations was evaluated by Franz cells, which consist of two compartments: the donor and receiver chambers. The latter was filled with saline solution as the receptor medium, and the system was kept at $32 \pm 1^\circ\text{C}$ with constant stirring. These experimental conditions provided the sink conditions. The two compartments are divided by a membrane that acts as an inert support for the formulation. The membrane used in this study was polytetrafluoroethylene (PTFE) 47 mm in diameter and 0.45 μm pore size (Merck, Spain). An amount of 0.3 g of formulation for either CPF-gel or CPF-AZ-gel was applied to the membrane in the donor chamber, and the drug diffused through the membrane into the receiver compartment was assessed over time by collecting samples (200 μL) at the following time points: 1, 2, 4, 6, 22, 26, and 28 h. The samples were analyzed by UPLC. 6 replicates for each formulation were included in this study.

The cumulative amount of caspofungin released was calculated and plotted as a function of time. The release rate was calculated by linear regression analysis as the slope of the linear part in the release profile. Kinetic modeling was performed to describe the behavior of caspofungin release over time. To this end, the data were fitted to several mathematical models, and the best-fitted one was chosen on the basis of the coefficient of determination (R^2).

4.9. Evaluation of the Permeation Capacity of Caspofungin through Ex Vivo Human Skin

To assess the potential of caspofungin to be absorbed into the bloodstream and determine the effectiveness of the gels developed as topical delivery systems, an *ex vivo* permeation test was conducted by Franz cells. The set-up is similar to the drug release test, with the particularity of using *ex vivo* human skin as a membrane. The skin was obtained from the abdominal area of donors subjected to aesthetic surgery; the “Docencia e Investigación” Committee of SCIAS Hospital de Barcelona approved the study (approval date 17 January 2020). The skin was cut at the thickness of 0.4 mm by a dermatome (Dermalab GA630 dermatome, Aesculap, Tuttlingen, Germany). This thickness presents the main layers of the skin: stratum corneum, viable epidermis, and a representative part of the dermis, which contains the blood vessels. The integrity of the skin discs was evaluated before the permeation test by measuring the transepidermal water loss (TEWL). Briefly, the sensor was placed on the skin for 2 min to allow it for temperature and humidity equilibration. Afterward, the TEWL values were recorded for 20 s, and only skin discs with TEWL below 13 g/h cm^2 were included in the study [43].

The permeation test was performed under an infinite dose approach, and 0.3 g of gel (CPF-gel or CPF-AZ-gel) was applied to the skin on the stratum corneum side, and samples were collected from the receiver medium at the time points 0.5, 1, 2, 4, 6, 22, 26 and 28 h. Samples were analyzed by UPLC to estimate the amount of caspofungin that permeated through the skin over time. Six replicates per formulation were included in the study. Once finished the permeation tests, 3 skin discs per formulation were destined for drug extraction, and the other 3 replicates were used for a histological evaluation.

To determine the amount of caspofungin that remained in the skin after 28 h of permeation, the skin discs were processed for drug extraction as follows: firstly, the excess gel on the skin surface was gently wiped and rinsed with distilled water; then, the diffusional area exposed to the formulations (2.54 cm^2) was cut, punched, and immersed in distilled water. The drug was extracted by ultrasonic technique for 20 min, and samples were analyzed by UPLC.

Data Analysis

The cumulative amounts of permeated caspofungin were plotted for each sampling time point. To evaluate the rate and extent of caspofungin permeation, we calculated the following permeation parameters: flux (J) as the permeation rate, expressed in $\mu\text{g/h}$; the lag-time (Tl), the

permeability coefficient (K_p), and the partition and diffusion coefficients (P_1 and P_2 , respectively) were also estimated, as well as we predicted the plasma concentration at the steady state that caspofungin would achieve after a topical application of the formulations, CPF-gel or CPF-AZ-gel, in a theoretical surface of application of 5 cm² [52].

The amount of caspofungin retained in the skin after 28 h of exposure was calculated by extracting the drug from the tissue and applying the factor of drug recovery in the skin of 45.5%.

4.10. Analytical Method for Determining Caspofungin

The samples from the drug release and permeation studies were analyzed by Ultra Performance Liquid Chromatography (UPLC) using an Acquity I-Class UPLC System (Waters, Milford, CT, USA). For the determination of caspofungin, we used a Lichrospher RP-8 column (125 x 4 mm, 5 μ m, Phenomenex) in gradient elution, which consisted of 50% B for 0–5 min; 100% B for 5–6 min and finally, 50% B for 6–8 min, being the composition of the mobile phase: A = 0.1 % of trifluoroacetic acid (TFA), and B = methanol. The flow rate was set at 0.8 mL/min, and we injected a sample volume of 10 μ L. The detection of caspofungin was carried out by an Acquity Fluorescence Detector at the excitation wavelength of 224 nm and emission wavelength of 304 nm [39].

4.11. Histological Analysis of the Ex Vivo Human Skin after Permeation of Caspofungin

The histological analysis aimed to examine the skin tissues to evaluate whether any alteration in the skin structure had occurred after the permeation study. To this end, 3 skin discs per formulation from the *ex vivo* permeation test was processed for the histological examination. After treatment with the different formulations, the skin was rinsed in PBS, dehydrated, and finally embedded in paraffin wax. Tissue sections of 5 μ m were stained with hematoxylin and eosin to assess the impact of the different formulations on the skin layers. Serum was used as a control condition, and ethanol was used as a positive control. Finally, the skin samples were observed under the microscope (Olympus BX41) and photographed (camera Olympus XC50).

4.12. Tolerance Studies by Evaluating Biomechanical Skin Properties

An *in vivo* skin tolerance study was conducted to evaluate the biomechanical properties of human skin. The study protocol was approved by the Ethics Committee of the University of Barcelona on 30/01/2019 (IRB00003099). The assessment of the total amount of water loss (TEWL) through the skin was carried out using a Tewameter® TM 300 (Courage-Khazaka Electronics GmbH, Cologne, Germany) to measure the amount of water reaching the surrounding atmosphere through the diffusion and evaporation processes of the epidermal layer of the skin. Ten healthy-skinned participants ranging in age from 25 to 40 years were recruited after medical assessment and notification (written informed consent) of the nature of the study and associated procedures. The subjects were asked not to use skin-care cosmetics on the measurement site (flexor side of the left forearm) during the day before the study. The volunteers stayed in the testing room for at least 20 min before taking the measurements. The measurement site was marked drawing circles around 4 cm in diameter. The readings were collected (baseline readings), and then we applied a uniform layer of 0.5 g of the formulations (CPF-gel and CPF-AZ-gel) to the center of the circle using a gentle tool using a circular motion with the thumb to help distribute samples. A total of 20 laps were carried out in a clockwise direction. New measurements were collected just after application and at 30-, 60-, 90-, and 120-min post-application [31]. To measure, the electrode, a small hollow cylinder, was maintained on the different tissue's surface for 1 min. TEWL values (g/m² h) were expressed as the mean SD of 10 replicates before and after the application of the formulations for at least 2 h. All measurements were carried out in accordance with published procedures [53,54].

The measurement of the hydration of the stratum corneum (SCH) was determined before application in the basal state and 5, 30-, 60-, 90-, and 120-min post-applications of CPF-gel and CPF-AZ-gel on the treated area using Corneometer® 825 a Multi Probe installed Hydration Adapter® MPA5 (Courage & Khazaka Electronics GmbH, Cologne, Germany). The measurements were performed using the capacitance method, which takes advantage of the relatively high dielectric constant of water compared to other skin substances. Stratum corneum hydration (SCH) values (arbitrary units, AU) are expressed as mean $\pm$ SD, $n = 10$.

4.13. Antimicrobial Efficacy

The *in vitro* antifungal activity of the prepared formulations was determined using the methodology described in the test protocol [citation from CLSI], similar to the disk diffusion method (also known as the Kirby-Bauer method) but with some modifications.

The *Candida* strains used in this assay were: *Candida albicans* ATCC 10231, *Candida glabrata* ATCC 66032, *Candida parapsilosis* ATCC 22019, and *Candida tropicalis* ATCC 7349 (American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA).

For the inoculum preparation, the culture medium was first prepared; Muller Hinton Agar (MH) supplemented with 2% glucose (MH-Glucose 2%) and 500 $\mu\text{g/mL}$ of chloramphenicol to avoid possible bacterial contamination by the excipients and incubating at 30°C for 48 h. Subsequently, each of the *Candida* strains was seeded. The fungal inoculum was prepared by suspending one to two isolated yeast colonies in Ringer's solution to achieve 0.5 McFarland equivalent density.

The 2% MH-glucose plates were inoculated three times over the entire surface of the agar with the aid of a swab soaked in the yeast with the scratching action, rotating the plate approximately 60° each time to ensure a good distribution of the inoculum.

The following formulations were studied: CPF-gel, CPF-AZ-gel, gel (excipient), and controls of 100 UI/mL nystatin and 250 $\mu\text{g/mL}$ amphotericin B. Approximately 5 μL of these products were placed in the inoculated yeast and incubated at 30°C for 48 h. The inhibition zone for yeast growth was observed.

Author Contributions: Conceptualization, A.C.C. and B.C.-N.; methodology, A.C.C.; validation, L.S. and M.M.; formal analysis, M.R., M.M. and A.C.C.; investigation, N.P.-G., J.S.-C. and N.B.-d.F.; resources, A.C.C., M.M. and B.C.-N.; data curation, L.C.E., M.R. and L.S.; writing—original draft preparation, N.P.-G., J.S.-C.; writing—review and editing, L.C.E., M.R., L.S. and M.M.; visualization, L.C.E., M.R., L.S. and M.M.; supervision, A.C.C. and B.C.-N.; project administration, A.C.C. and B.C.-N.; funding acquisition, A.C.C., M.M. and B.C.-N. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research received no external funding.

Institutional Review Board Statement: The study was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki and approved by the Institutional Review Board (or Ethics Committee) of the University of Barcelona (IRB00003099, dated 30 January 2019).

Informed Consent Statement: Informed consent was obtained from all subjects involved in the study.

Data Availability Statement: Data is contained within the article.

Acknowledgments: The authors would like to thank T. Huang for her support in the permeation studies; M.J. Rodríguez-Lagunas for her support in the histological analysis, and A. Boix for his assistance in the administrative procedures for the ethical committee approval.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

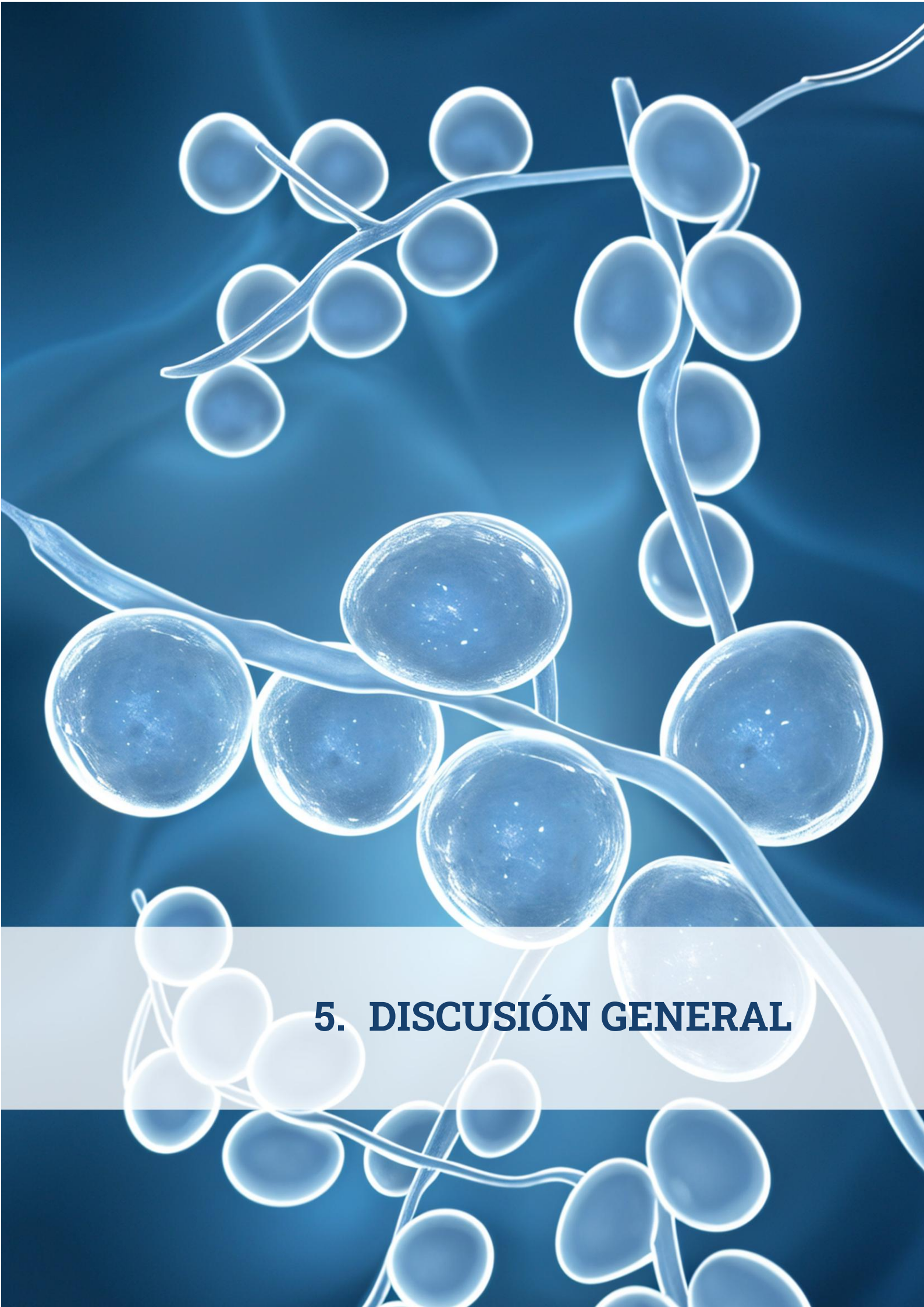
References

1. Sawant, B.; Khan, T. Recent Advances in Delivery of Antifungal Agents for Therapeutic Management of Candidiasis. *Biomed. Pharmacother.* **2017**, *96*, 1478–1490. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)].
2. Talapko, J.; Juzbasic, M.; Matijevic, T.; Pustijanac, E.; Bekic, S.; Kotris, I.; Skrlac, I. Candida Albicans—The Virulence Factors and Clinical Manifestations of Infection. *J. Fungi* **2021**, *7*, 79. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Espinoza, L.C.; Sosa, L.; Granda, P.C.; Bozal, N.; Diaz-Garrido, N.; Chulca-Torres, B.; Calpena, A.C. Development of a Topical Amphotericin B and Bursera Graveolens Essential Oil-Loaded Gel for the Treatment of Dermal Candidiasis. *Pharmaceuticals* **2021**, *14*, 1033. [[CrossRef](#)]
4. Hussein, M.; Wong, L.J.M.; Zhao, J.; Rees, V.E.; Allobawi, R.; Sharma, R.; Rao, G.G.; Baker, M.; Li, J.; Velkov, T. Unique Mechanistic Insights into Pathways Associated with the Synergistic Activity of Polymyxin B and Caspofungin against Multidrug-Resistant Klebsiella Pneumoniae. *Comput. Struct. Biotechnol. J.* **2020**, *20*, 1077–1087. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Saadi Ali, H.; Barzani, H.A.H.; Yardim, Y.; Şentürk, Z. First Electrochemical Study of a Potent Antifungal Drug Caspofungin: Application to Its Enhanced Voltammetric Sensing Based on the Performance of Boron-Doped Diamond Electrode in CTAB- Mediated Measurements. *Diam. Relat. Mater.* **2022**, *125*, 109031. [[CrossRef](#)]
6. Wang, Y.; Yan, H.; Li, J.; Zhang, Y.; Wang, Z.; Sun, S. Antifungal Activity and Potential Mechanism of Action of Caspofungin in Combination with Ribavirin against Candida Albicans. *Int. J. Antimicrob. Agents* **2023**, *61*, 106709. [[CrossRef](#)]
7. Deresinski, S.; Stevens, D.C. Caspofungin. *Infect. Dis.* **2003**, *36*, 1445–1457. [[CrossRef](#)]
8. Patil, A.; Majumdar, S. Echinocandins in Antifungal Pharmacotherapy. *J. Pharm. Pharmacol.* **2017**, *69*, 1635–1660. [[CrossRef](#)]
9. Mroczynska, M.; Brillowska-Dabrowska, A. Review on Current Status of Echinocandins Use. *Antibiotics* **2020**, *9*, 227. [[CrossRef](#)]
10. Alshehri, A.F.; Almangour, T.A.; Alhifany, A.A.; Alhossan, A. Assessment of Caspofungin Use at a Tertiary Teaching Hospital and Compliance with IDSA Guidelines and FDA Labelings. *Saudi Pharm. J.* **2022**, *30*, 212–216. [[CrossRef](#)]
11. Chandel, A.K.S.; Nutan, B.; Raval, I.H.; Jewrajka, S.K. Self-Assembly of Partially Alkylated Dextran-Graft-Poly[(2- Dimethylamino)Ethyl Methacrylate] Copolymer Facilitating Hydrophobic/Hydrophilic Drug Delivery and Improving Conetwork Hydrogel Properties. *Biomacromolecules* **2018**, *19*, 1142–1153. [[CrossRef](#)]
12. Vasile, C.; Pamfil, D.; Stoleru, E.; Baican, M. New Developments in Medical Applications of Hybrid Hydrogels Containing Polymers. *Molecules* **2020**, *25*, 1539. [[CrossRef](#)]
13. Islam, M.; Park, T.-E.; Reesor, E.; Cherukula, K.; Hasan, A.; Firdous, J.; Singh, B.; Kang, S.-K.; Choi, Y.-J.; Park, I.-K.; et al. Mucoadhesive Chitosan Derivatives as Novel Drug Carriers. *Curr. Pharm. Des.* **2015**, *21*, 4285–4309. [[CrossRef](#)]
14. Jiménez-Gómez, C.P.; Cecilia, J.A. Chitosan: A Natural Biopolymer with a Wide and Varied Range of Applications. *Molecules* **2020**, *25*, 3981. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Sahariah, P.; Másson, M. Antimicrobial Chitosan and Chitosan Derivatives: A Review of the Structure—Activity Relationship. *Biomacromolecules* **2017**, *18*, 3846–3868. [[CrossRef](#)]
16. Antunes, F.E.; Gentile, L.; Rossi, C.O.; Tavano, L.; Ranieri, G.A. Gels of Pluronic F127 and Nonionic Surfactants from Rheological to Controlled Drug Permeation. *Colloids Surf. B Biointerfaces* **2011**, *87*, 42–48. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Ruan, J.; Liu, C.; Song, H.; Zhong, T.; Quan, P.; Fang, L. A Skin Pharmacokinetics Study of Permeation Enhancers: The Root Cause of Dynamic Enhancement Effect on In Vivo Drug Permeation. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2023**, *184*, 170–180. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Carvajal-Vidal, P.; Mallandrich, M.; Garcia, M.L.; Calpena, A.C. Effect of Different Skin Penetration Promoters in Halobetasol Propionate Permeation and Retention in Human Skin. *Int. J. Mol. Sci.* **2017**, *18*, 2475. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Chen, Y.; Quan, P.; Liu, X.; Wang, M.; Fang, L. Novel Chemical Permeation Enhancers for Transdermal Drug Delivery. *Asian J. Pharm. Sci.* **2014**, *9*, 51–64. [[CrossRef](#)]
20. Williams, A.C.; Barry, B.W. Penetration Enhancers. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2012**, *64*, 128–137. [[CrossRef](#)]

21. Karande, P.; Mitragotri, S. Enhancement of Transdermal Drug Delivery via Synergistic Action of Chemicals. *Biochim. Biophys. Acta* **2009**, *1788*, 2362–2373. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Lane, M.E. Skin Penetration Enhancers. *Int. J. Pharm.* **2013**, *447*, 12–21. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Lee, S.G.; Kang, J.; Kim, S.; Kim, C.; Yeom, D.; Yoon, H.; Kwak, S.; Choi, Y. Enhanced Topical Delivery of Tacrolimus by a CarbomerHydrogel Formulation with Transcutol P. *Drug Dev. Ind. Pharm.* **2016**, *42*, 1636–1642. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Pitzanti, G.; Rosa, A.; Nieddu, M.; Valenti, D.; Pireddu, R.; Lai, F.; Cardia, M.; Fadda, A.; Sinico, C. Transcutol® P Containing SLNs for Improving 8-Methoxypsoralen Skin Delivery. *Pharmaceutics* **2020**, *12*, 973. [[CrossRef](#)]
25. Sanz, R.; Calpena, A.; Mallandrich, M.; Gimeno, Á.; Halbaut, L.; Clares, B. Development of a Buccal Doxepin Platform for Pain in Oral Mucositis Derived from Head and Neck Cancer Treatment. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2017**, *117*, 203211. [[CrossRef](#)]
26. Ciurlizza, C.; Fernández, F.; Calpena, A.C.; Lázaro, R.; Parra, A.; Clares, B. Semisolid Formulations Containing Cetirizine: HumanSkin Permeation and Topical Antihistaminic Evaluation in a Rabbit Model. *Arch. Dermatol. Res.* **2014**, *306*, 711–717. [[CrossRef](#)]
27. Letscher-Bru, V.; Herbrecht, R. Caspofungin: The First Representative of a New Antifungal Class. *J. Antimicrob. Chemother.* **2003**, *51*, 513–521. [[CrossRef](#)]
28. Sullivan, D.W.; Gad, S.C.; Julien, M. A Review of the Nonclinical Safety of Transcutol®, a Highly Purified Form of Diethylene Glycol Monoethyl Ether (DEGEE) Used as a Pharmaceutical Excipient. *Food Chem. Toxicol.* **2014**, *72*, 40–50. [[CrossRef](#)]
29. Mfoafo, K.; Kwon, Y.; Omid, Y.; Omidian, H. Contemporary Applications of Thermogelling PEO-PPO-PEO Triblock Copolymers. *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* **2022**, *70*, 103182. [[CrossRef](#)]
30. Soliman, K.A.; Ullah, K.; Shah, A.; Jones, D.S.; Singh, T.R.R. Poloxamer-Based in Situ Gelling Thermoresponsive Systems for Ocular Drug Delivery Applications. *Drug Discov. Today* **2019**, *24*, 1575–1586. [[CrossRef](#)]
31. Zarrintaj, P.; Ramsey, J.D.; Samadi, A.; Atoufi, Z.; Yazdi, M.K.; Ganjali, M.R.; Amirabad, L.M.; Zangene, E.; Farokhi, M.; Formela, K.; et al. Poloxamer: A Versatile Tri-Block Copolymer for Biomedical Applications. *Acta Biomater.* **2020**, *110*, 37–67. [[CrossRef](#)]
32. Sacco, P.; Furlani, F.; de Marzo, G.; Marsich, E.; Paoletti, S.; Donati, I. Concepts for Developing Physical Gels of Chitosan and of Chitosan Derivatives. *Gels* **2018**, *4*, 67. [[CrossRef](#)]
33. Samani, S.M.; Ahmadi, F.; Oveisi, Z.; Amoozgar, Z. Chitosan Based Hydrogels: Characteristics and Pharmaceutical Applications. *Res. Pharm. Sci.* **2015**, *10*, 1–16.
34. Wang, W.Y.; Hui, P.C.L.; Wat, E.; Ng, F.S.F.; Kan, C.W.; Lau, C.B.S.; Leung, P.C. Enhanced Transdermal Permeability via Constructing the Porous Structure of Poloxamer-Based Hydrogel. *Polymers* **2016**, *8*, 406. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Desai, P.R.; Jain, N.J.; Sharma, R.K.; Bahadur, P. Effect of Additives on the Micellization of PEO/PPO/PEO Block Copolymer F127in Aqueous Solution. *Colloids Surf. A Physicochem. Eng. Asp.* **2001**, *178*, 57–69. [[CrossRef](#)]
36. Raina, N.; Pahwa, R.; Bhattacharya, J.; Paul, A.K.; Nissapatorn, V.; Pereira, M.d.L.; Oliveira, S.M.R.; Dolma, K.G.; Rahmatullah, M.; Wilairatana, P.; et al. Drug Delivery Strategies and Biomedical Significance of Hydrogels: Translational Considerations. *Pharmaceutics* **2022**, *14*, 574. [[CrossRef](#)]
37. Espinoza, L.C.; Guaya, D.; Calpena, A.C.; Perotti, R.M.; Halbaut, L.; Sosa, L.; Brito-Llera, A.; Mallandrich, M. Comparative Study of Donepezil-Loaded Formulations for the Treatment of Alzheimer's Disease by Nasal Administration. *Gels* **2022**, *8*, 715. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Berenguer, D.; Alcover, M.M.; Sessa, M.; Halbaut, L.; Guillen, C.; Boix-Montanes, A.; Fisa, R.; Calpena-Campmany, A.C.; Riera, C.; Sosa, L. Topical Amphotericin B Semisolid Dosage Form for Cutaneous Leishmaniasis: Physicochemical Characterization, Ex Vivo Skin Permeation and Biological Activity. *Pharmaceutics* **2020**, *12*, 149. [[CrossRef](#)]
39. Perez-Gonzalez, N.; Bozal-de Febrer, N.; Calpena-Campmany, A.C.; Nardi-Ricart, A.; Rodriguez-Lagunas, M.J.; Morales-Molina, J.A.; Soriano-Ruiz, J.L.; Fernandez-Campos, F.; Clares-Naveros, B. New Formulations Loading Caspofungin for Topical Therapy of Vulvovaginal Candidiasis. *Gels* **2021**, *7*, 259. [[CrossRef](#)]

40. Brugués, A.P.; Naveros, B.C.; Campmany, A.C.C.; Pastor, P.H.; Saladrigas, R.F.; Lizandra, C.R. Developing Cutaneous Applications of Paromomycin Entrapped in Stimuli-Sensitive Block Copolymer Nanogel Dispersions. *Nanomedicine* **2015**, *10*, 227–240. [[CrossRef](#)]
41. European Medicines Agency. *Draft Guideline on Quality and Equivalence of Topical Products*; European Medicines Agency: London, UK, 2018.
42. Ilic, T.; Pantelic, I.; Savic, S. The Implications of Regulatory Framework for Topical Semisolid Drug Products: From Critical Quality and Performance Attributes towards Establishing Bioequivalence. *Pharmaceutics* **2021**, *13*, 710. [[CrossRef](#)]
43. Dey, S.; Rothe, H.; Page, L.; O'Connor, R.; Farahmand, S.; Toner, F.; Marsh, R.; Wehmeyer, K.; Zhou, S. An In Vitro Skin Penetration Model for Compromised Skin: Estimating Penetration of Polyethylene Glycol [(1)(4)C]-PEG-7 Phosphate. *Skin Pharmacol. Physiol.* **2015**, *28*, 12–21. [[CrossRef](#)]
44. Kulkarni, V.S.; Shaw, C. Use of Polymers and Thickeners in Semisolid and Liquid Formulations. In *Essential Chemistry for Formulators of Semisolid and Liquid Dosages*; Kulkarni, V.S., Shaw, C., Eds.; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2016; pp. 43–69.
45. Mohammadi-Meyabadi, R.; Beirampour, N.; Garros, N.; Alvarado, H.L.; Limon, D.; Silva-Abreu, M.; Calpena, A.C.; Mallandrich, M. Assessing the Solubility of Baricitinib and Drug Uptake in Different Tissues Using Absorption and Fluorescence Spectroscopies. *Pharmaceutics* **2022**, *14*, 2714. [[CrossRef](#)]
46. Osborne, D.W.; Musakhanian, J. Skin Penetration and Permeation Properties of Transcutol(R)-Neat or Diluted Mixtures. *AAPS PharmSciTech* **2018**, *19*, 3512–3533. [[CrossRef](#)]
47. Montero-Vilchez, T.; Segura-Fernandez-Nogueras, M.V.; Perez-Rodriguez, I.; Soler-Gongora, M.; Martinez-Lopez, A.; Fernandez-Gonzalez, A.; Molina-Leyva, A.; Arias-Santiago, S. Skin Barrier Function in Psoriasis and Atopic Dermatitis: Transepidermal Water Loss and Temperature as Useful Tools to Assess Disease Severity. *J. Clin. Med.* **2021**, *10*, 359. [[CrossRef](#)][[PubMed](#)]
48. Mori, M.; Imaizumi, M.; Ishiwada, N.; Kaneko, T.; Goto, H.; Kato, K.; Hara, J.; Kosaka, Y.; Koike, K.; Kawamoto, H. Pharmacokinetics, Efficacy, and Safety of Caspofungin in Japanese Pediatric Patients with Invasive Candidiasis and Invasive Aspergillosis. *J. Infect. Chemother.* **2015**, *21*, 421–426. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
49. Farmakiotis, D.; Tarrand, J.J.; Kontoyiannis, D.P. Drug-resistant *Candida glabrata* infection in cancer patients. *Emerg. Infect. Dis.* **2014**, *20*, 1833–1840. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
50. Raafat, D.; von Bargen, K.; Haas, A.; Sahl, H.G. Insights into the Mode of Action of Chitosan as an Antibacterial Compound. *Appl. Environ. Microbiol.* **2008**, *74*, 3764–3773. [[CrossRef](#)]
51. Park, E.K.; Song, K.W. Rheological Evaluation of Petroleum Jelly as a Base Material in Ointment and Cream Formulations: Steady Shear Flow Behavior. *Arch. Pharm. Res.* **2010**, *33*, 141–150. [[CrossRef](#)]
52. El Moussaoui, S.; Fernández-Campos, F.; Alonso, C.; Limón, D.; Halbaut, L.; Garduño-Ramírez, M.L.; Calpena, A.C.; Mallandrich, M. Topical Mucoadhesive Alginate-Based Hydrogel Loading Ketorolac for Pain Management after Pharmacotherapy, Ablation, or Surgical Removal in Condyloma Acuminata. *Gels* **2021**, *7*, 8. [[CrossRef](#)]
53. Rincon, M.; Silva-Abreu, M.; Espinoza, L.C.; Sosa, L.; Calpena, A.C.; Rodriguez-Lagunas, M.J.; Colom, H. Enhanced Transdermal Delivery of Pranoprofen Using a Thermo-Reversible Hydrogel Loaded with Lipid Nanocarriers for the Treatment of Local Inflammation. *Pharmaceutics* **2021**, *15*, 22. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. El Moussaoui, S.; Abo-horan, I.; Halbaut, L.; Alonso, C.; Coderch, L.; Garduño-ramírez, M.L.; Clares, B.; Soriano, J.L.; Calpena, A.C.; Fernández-campos, F.; et al. Polymeric Nanoparticles and Chitosan Gel Loading Ketorolac Tromethamine to Alleviate Pain Associated with Condyloma Acuminata during the Pre- and Post-ablation. *Pharmaceutics* **2021**, *13*, 1784. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

Disclaimer/Publisher's Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

A microscopic image of yeast cells and hyphae, rendered in a blue-tinted, semi-transparent style. The cells are spherical and clustered along thin, branching filamentous structures. The background is a deep blue with a subtle, wavy texture.

5. DISCUSIÓN GENERAL

El incremento de infecciones fúngicas oportunistas supone un importante desafío en el ámbito clínico, especialmente en pacientes con sistemas inmunológicos comprometidos y con comorbilidades que afectan a su respuesta inmunitaria. Este escenario ha puesto de manifiesto importantes limitaciones en los tratamientos antifúngicos convencionales, como pueden ser los efectos secundarios sistémicos, la baja biodisponibilidad en los tejidos afectados y la aparición de resistencias, particularmente en cepas como *C. auris* y *C. glabrata*. Estas limitaciones destacan la necesidad de desarrollar nuevas estrategias terapéuticas más eficaces y seguras.

Dentro de este marco, CSP surge como una opción prometedora para el tratamiento tópico de infecciones mucocutáneas gracias a su mecanismo de acción, basado en la inhibición de la β -1,3-D-glucano sintasa. Aunque su uso ha estado tradicionalmente limitado a la administración intravenosa. Este proyecto explora por primera vez el potencial de CSP en formulaciones para la administración tópica en la boca, la vagina y la piel, aunque ya se ha documentado su uso para aplicaciones oculares (Hurtado-Sarrió et al., 2010).

La presente tesis doctoral se ha centrado en el diseño, desarrollo y caracterización de formulaciones basadas en CSP, con el objetivo de tratar infecciones fúngicas en mucosas y piel. Se han explorado cuatro aplicaciones: queratitis fúngica, candidiasis oral, vulvovaginal y cutánea. Cada formulación busca superar las barreras fisiológicas de cada tejido, optimizando su biodisponibilidad y eficacia local.

Este apartado presenta una discusión detallada de los hallazgos más significativos y sus posibles implicaciones clínicas, destacando la originalidad de la investigación. En ausencia de formulaciones comercializadas de este tipo, los resultados se discuten en el contexto de los diferentes tejidos de aplicación. A través de esta discusión, se ponen de manifiesto las fortalezas de las formulaciones de CSP y se sugieren futuras líneas de investigación que podrían contribuir a mejorar aún más la efectividad de estos enfoques terapéuticos.

5.1. Formulaciones oculares

La queratitis fúngica representa una de las principales causas de ceguera corneal a nivel mundial. Entre los tratamientos utilizados se encuentran colirios antifúngicos como el fluconazol, itraconazol, el voriconazol y anfotericina B, así como inyecciones intravítreas de voriconazol y anfotericina B, los cuales suelen prepararse como fórmulas magistrales. Aunque también se puede emplear natamicina, su aplicación es menos frecuente en España debido a los largos tiempos de importación, ya que no está comercializada en el país. Su uso debe ser autorizado como medicamento extranjero conforme al Real Decreto 1015/2009, que regula la disponibilidad de medicamentos en situaciones especiales. A pesar de su uso, estos tratamientos presentan limitaciones como baja penetración corneal, efectos adversos

locales y eficacia reducida frente a cepas resistentes como *C. auris*. En el caso de los colirios, la producción lagrimal y el parpadeo contribuyen a su rápida eliminación, lo que reduce su efectividad terapéutica, mientras que las inyecciones intravítreas, a pesar de ofrecer una mayor concentración del fármaco en las estructuras internas del ojo, implican un procedimiento invasivo.

En diferentes estudios sobre queratitis, se ha utilizado CSP a concentraciones que van del 0.5 al 1% con resultados prometedores (Hurtado-Sarrió et al., 2010; Neoh et al., 2011). Para abordar las limitaciones de los tratamientos convencionales se diseñaron tres tipos de formulaciones con CSP al 0,50%: una **solución salina fisiológica** simple, una **solución con P407 al 0,20%**, y un **hidrogel con un 18% de P407**, capaz de gelificar al contacto con la temperatura fisiológica, prolongar el tiempo de residencia en la superficie ocular y facilitar la liberación del fármaco (sección 4.2 del artículo 1). Todas las formulaciones fueron ampliamente caracterizadas y los resultados demostraron características adecuadas para la aplicación oftálmica.

La estabilidad, evaluada en términos de pH y apariencia visual a 4, 25 y 32°C durante tres semanas, mostró resultados prometedores (Tabla 1 del artículo 1). Los valores de pH se mantuvieron constantes en todas las muestras, sin diferencias significativas entre las temperaturas. En cuanto a la apariencia, las formulaciones con P407 conservaron transparencia y ausencia de precipitados a 4 y 25°C mientras que, a 32°C, desarrollaron un leve tono amarillo. Este hecho podría deberse a la disociación de las micelas formadas por el polímero (Brugués et al., 2015; Singla et al., 2019; Zhang et al., 2016). Aunque el P407 es termorresistente, a esta temperatura las micelas podrían disociarse en monómeros que expondrían la CSP a degradación, lo que explicaría el cambio de color observado. En contraste, la formulación que carece de P407 mostró una mayor susceptibilidad térmica, adquiriendo un color amarillento tanto a 25 como a 32°C. Esto sugiere que, sin el polímero, la CSP es más susceptible a la degradación por calor. Por tanto, estos hallazgos subrayan la importancia del P407 en la protección del fármaco frente a la degradación térmica y, en consecuencia, en la mejora de la estabilidad.

La caracterización reológica de las formulaciones es fundamental en el desarrollo de sistemas de administración ocular, ya que permite evaluar las propiedades de flujo y viscosidad, aspectos determinantes para la aplicación. Estos estudios son esenciales para optimizar la retención del fármaco y garantizar la liberación del mismo. Las soluciones desarrolladas mostraron un comportamiento newtoniano, exhibiendo una disminución progresiva de la viscosidad al aumentar la temperatura, lo que refleja su naturaleza homogénea y estable (Tabla 2 y Figura 2 del artículo 1). Sin embargo, este comportamiento puede reducir su tiempo de permanencia en la superficie ocular tras la aplicación.

Por su parte, el hidrogel responde a la temperatura, actuando como líquido a bajas temperaturas (4°C) para transformarse en gel a 32°C, aumentando significativamente su

viscosidad en condiciones similares a la temperatura corporal (Soriano et al., 2020). Este cambio en el perfil reológico (Tabla 2 del artículo 1), favorece la creación de una película estable sobre la superficie ocular, promoviendo la liberación controlada del fármaco. Además, el hidrogel presentó un comportamiento tixotrópico a temperaturas de 25 y 32°C, evidenciado por bucles de histéresis en los reogramas (Figura 2 del artículo 1), lo que contribuye a una mejor distribución y mayor retención del gel en el ojo (Acosta et al., 2015; Berenguer et al., 2020; Giuliano et al., 2018; Sanz et al., 2018). El test de barrido de temperatura mostró un cambio de estado de solución líquida a gel alrededor de los 19°C, indicando el comienzo de la gelificación *in situ*.

El análisis mediante espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) (Figura 3 del artículo 1) confirmó que no hubo interacciones químicas entre la CSP y los polímeros utilizados, lo que asegura que la integridad estructural y la eficacia del fármaco se mantuvieron dentro de las formulaciones. Este resultado respalda la viabilidad de los sistemas diseñados para conservar la actividad del principio activo.

Por primera vez, este estudio ha evaluado los parámetros de la hidratación basal del tejido ocular y la pérdida de agua transocular (TOWL) *ex vivo*, permitiendo analizar el impacto de las formulaciones en la córnea y la esclera. Los resultados mostraron una deshidratación progresiva en los tejidos oculares no tratados (Figura 4 del artículo 1), especialmente en la esclera, por la falta de mecanismos naturales de humectación, como el parpadeo y la secreción de lágrimas. Las soluciones resultaron ser muy efectivas para proteger tanto la córnea como la esclera de la deshidratación, mostrando un efecto más constante en comparación con el hidrogel. Este, por otro lado, tuvo una eficacia inicial menos favorable en términos de hidratación. El alto contenido de agua en las soluciones no solo contribuyó a esta protección, sino que también aumentó significativamente la hidratación de los tejidos oculares tras su aplicación.

Por otro lado, los valores de TOWL (Figura 5 del artículo 1) aumentaron tras el contacto inicial con las formulaciones, especialmente en los primeros 30 minutos. A partir de los 90 minutos, la solución salina alcanzó valores de TOWL comparables a los de la córnea no tratada, mostrando un comportamiento similar en la esclera. Por su parte, las formulaciones con P407, demostraron ser capaces de reducir la evaporación en los primeros 60 min. El hidrogel fue la formulación más eficaz en minimizar la pérdida de agua en la esclera, probablemente debido a las diferencias estructurales entre los tejidos (Meek, 2008).

Es crucial destacar que el método utilizado para los estudios de hidratación basal del tejido ocular *ex vivo* y TOWL no refleja las condiciones dinámicas del ojo, como el parpadeo o la renovación constante de la película lagrimal. Por lo que será necesario realizar estudios *in vivo* para validar estas observaciones y confirmar su relevancia clínica.

El estudio de liberación indicó que todas las formulaciones fueron capaces de liberar la CSP, indicando que el fármaco podría tener el potencial para atravesar las membranas oculares sin impedimentos significativos. Los perfiles de liberación se ajustaron a una cinética hiperbólica que, en su fase inicial, muestra un comportamiento de orden 1, lo que implica que la tasa de liberación es proporcional a la cantidad de fármaco pendiente de liberar. En este modelo, el parámetro K_d representa el tiempo necesario para alcanzar el 50% de la liberación máxima, B_{max} . (Figura 6 del artículo 1). Sin embargo, la eficacia clínica dependerá de la interacción entre la velocidad de liberación y la cantidad total de fármaco disponible a lo largo del tiempo.

El análisis de los perfiles de permeación en tejidos oculares mostró diferencias significativas entre la córnea y la esclera (Figura 7 del artículo 1). En la córnea, el hidrogel presentó la mayor permeación, seguido de la solución salina, mientras que la solución con baja concentración de P407 tuvo la menor permeación. En contraste, en la esclera, la solución salina mostró una permeación rápida, superando al hidrogel y a la solución con baja concentración de P407. Estas variaciones podrían explicarse por las diferencias en la estructura y el grosor de los tejidos (Doughty & Jonuscheit, 2019), con una mayor retención de fármaco en la esclera que en la córnea. Todas las formulaciones demostraron su capacidad para penetrar en los tejidos oculares, lo que indica que CSP podría llegar al humor acuoso a través de la córnea y al humor vítreo a través de la esclera.

Además de los estudios de liberación y permeación, se realizaron análisis histológicos para evaluar el impacto de las formulaciones en la integridad estructural de la córnea y la esclera. Los resultados mostraron que las formulaciones, en general, no indujeron cambios significativos en comparación con el control negativo (Figura 8 del artículo 1). Como era de esperar, el tratamiento con el control positivo (etanol-agua 50:50) provocó la pérdida del epitelio corneal y alteraciones en la esclera, especialmente en el coroides, capa rica en vasos sanguíneos, melanocitos y fibroblastos. Por otro lado, las soluciones no produjeron cambios significativos en los tejidos, mientras que el hidrogel provocó aflojamiento en el estroma corneal y contracción del coroides. Tras el estudio se podría decir que las soluciones son más idóneas para la aplicación ocular, destacando la solución con P407 a baja concentración.

La eficacia de CSP frente a diversas cepas de *Candida* está bien documentada (Jírová et al., 2014), y los hallazgos de este estudio respaldan su efectividad. Las formulaciones demostraron una alta eficacia contra cuatro de las cinco cepas de *Candida*, destacando su potencial terapéutico (Tabla 5 del artículo 1). Sin embargo, la persistencia de crecimiento en *C. auris* después de 48 horas sugiere una posible limitación frente a esta cepa, lo que podría complicar el tratamiento de infecciones causadas por este patógeno. Adicionalmente, las formulaciones sin CSP también demostraron una capacidad para inhibir el crecimiento de *Candida*, especialmente aquellas con alta concentración de P407. Este resultado indica que

el poloxamer podría contribuir de manera complementaria a la actividad antifúngica (Garrós et al., 2022), una idea que merece ser investigada en estudios futuros.

Finalmente, Para evaluar la seguridad ocular de las formulaciones, se realizó el ensayo HET-CAM, un método reconocido para determinar el potencial irritante de productos oftálmicos. Los resultados del ensayo determinaron que las formulaciones no son irritantes, con puntuaciones de irritación por debajo de 0.09 (Silva-Abreu et al., 2018), lo que indica un buen perfil de tolerancia en condiciones experimentales (Tabla 6 del artículo 1). Sin embargo, se detectaron diferencias entre las formulaciones al evaluar la transparencia corneal (Figura 10 del artículo 1). La solución salina causó algunos cambios en la transparencia de la córnea, lo que sugiere que su efecto es diferente al de las formulaciones con P407. Entre las formulaciones con el polímero, el hidrogel demostró ser más eficiente a la hora de preservar la transparencia corneal en comparación con la solución con baja concentración de P407, lo que demuestra que no todas las formulaciones tienen el mismo impacto en la integridad corneal.

Es importante destacar que la membrana corioalantoidea es altamente sensible a los productos químicos (Garrós et al., 2022; Silva-Abreu et al., 2018), lo que demuestra la capacidad del ensayo para identificar posibles irritaciones en un entorno controlado. Aunque los resultados sugieren un perfil seguro para todas las formulaciones, es crucial realizar estudios adicionales para confirmar la eficacia y seguridad sin tener que recurrir a pruebas en humanos. Métodos avanzados, como el análisis de dispersión de rayos X de sincrotrón, podrían proporcionar información detallada sobre la estructura del colágeno corneal, factor esencial para la transparencia ocular (Miralles et al., 2022; Silva-Abreu et al., 2021).

Tal y como se ha comentado anteriormente, debe considerarse que los métodos utilizados en la mayorías de los ensayos son estáticos y no reproducen completamente las condiciones dinámicas del ojo. Por lo que sería necesario llevar a cabo estudios *in vivo* para confirmar estos hallazgos en un contexto fisiológico, garantizando que los resultados sean representativos de las condiciones de uso clínico reales.

5.2. Formulaciones bucales

Los pacientes sometidos a quimio/radioterapia por cánceres en la cabeza y orofaringe experimentan múltiples efectos secundarios, tanto inmediatos como progresivos. Destacan los trastornos de la mucosa oral, que afectan severamente la integridad bucal y disminuyen su calidad de vida. Las complicaciones orales más frecuentes son la xerostomía, las alteraciones del gusto y la candidiasis oral.

Para lograr una cobertura total de la cavidad oral, se desarrollaron formulaciones líquidas y semisólidas. Se diseñaron **dos enjuagues bucales**: uno a base de **saliva artificial**

(ASM) y otro a base de **jarabe simple**. Las formulaciones semisólidas incluyeron dos **hidrogeles y una pasta grasa**. Uno de los hidrogeles se formuló con **chitosán al 2%** mientras que el otro se formuló con **P407 al 20%**. Para la pasta grasa se utilizó un preparado comercial llamado **Orafix®** (Tabla 1 del artículo 2). Todas las formulaciones fueron caracterizadas de manera rigurosa con el fin de verificar su idoneidad para ser aplicadas tópicamente.

A la hora de diseñar sistemas de liberación de fármacos, los excipientes juegan un papel esencial. Para la primera formulación, se eligió **ASM** como vehículo del enjuague bucal por su capacidad para simular el entorno natural de la saliva, lo que permite recrear de manera más fiel las condiciones de la cavidad oral, contribuyendo a la obtención de resultados más fiables. Además, la saliva artificial puede ayudar a mantener la homeostasis, ofreciendo una alternativa más versátil en comparación con un tampón fosfato. Este medio artificial contiene mucina, conocida por desempeñar un importante papel en diversas funciones como lubricar y proteger las membranas mucosas de la boca y garganta, facilitando el movimiento de los alimentos y la deglución. Además, crea una barrera que evita la deshidratación, protege contra irritaciones e infecciones, y es crucial para la formación de la biopelícula dental, proporcionando defensa contra las caries y otras enfermedades bucales (Frenkel & Ribbeck, 2015). El segundo enjuague bucal se realizó con **jarabe simple** como vehículo al que se incorporó ácido hialurónico (<250 kDa) a baja concentración. El jarabe simple se empleó para mejorar las propiedades organolépticas de la formulación, mientras que el ácido hialurónico, al ser de bajo peso molecular, favorece una mayor penetración en los tejidos, contribuyendo a la hidratación y regeneración celular. Además, se ha descrito que el ácido hialurónico puede modular la respuesta inflamatoria y favorecer la reparación tisular, lo que podría beneficiar la mucosa oral en condiciones inflamatorias (Litwiniuk et al., 2016). Su inclusión en el enjuague bucal podría proporcionar una sensación de suavidad y comodidad, mejorando la aceptación del producto por parte del paciente (Rosa et al., 2024).

Con respecto a los hidrogeles, el **chitosán** fue seleccionado debido a su biocompatibilidad, lo que garantiza su seguridad al contacto con la mucosa bucal. Además, presenta propiedades intrínsecas antifúngicas y mucoadhesivas, convirtiéndolo en un excelente candidato para aplicaciones en forma de hidrogel (Genesi et al., 2023). Estas propiedades permiten mejorar la adherencia del gel a las superficies mucosas, facilitando la liberación prolongada del fármaco y aumentando la efectividad del tratamiento. Así mismo, su capacidad para formar complejos con otros agentes antimicrobianos mejora la actividad antifúngica local (Abd El-Hack et al., 2020; Yan et al., 2021). El **P407** se empleó por su capacidad para transformarse de una solución líquida a un gel a la temperatura corporal, crucial para una liberación controlada y focalizada del fármaco en la cavidad bucal. Actuando como un agente gelificante, el P407 mantiene la estructura de la formulación durante su aplicación, lo que permite una liberación sostenida y efectiva del fármaco en el sitio de acción. Además, mejora la comodidad del paciente al adaptarse mejor a las

condiciones propias de la cavidad bucal, lo que facilita su aplicación y aumenta el confort durante el uso (de Castro et al., 2023; Galindo-Camacho et al., 2023; Galocha-León et al., 2023).

Finalmente, se utilizó **Orafix**[®] debido a su amplio uso en la práctica dental como pasta adhesiva oral. Este excipiente es conocido por su capacidad para formar una capa protectora sobre las mucosas orales, lo que no solo mejora la adherencia del producto, sino que también contribuye a la protección de las áreas tratadas (Patel et al., 2011; Petelin et al., 2004; Sanz et al., 2017).

Hasta donde sabemos, no existen datos previos en la literatura que recomienden la concentración tópica más adecuada de CSP para el tratamiento de la candidiasis oral como una complicación de la quimioterapia o mucositis oral inducida por radiación. La selección de la concentración de CSP debe basarse en estudios farmacocinéticos y farmacodinámicos, así como la concentración mínima inhibitoria (CMI), para lograr un valor adecuado de probabilidad de alcanzar el objetivo terapéutico (PTA; del inglés probability of therapeutic achievement). Dado que CSP es un medicamento de uso hospitalario, especialmente en pacientes con pocas opciones de tratamiento, se optó por una concentración del 2%, según nuestra revisión de la literatura sobre antifúngicos administrados tópicamente. Esta dosis fue seleccionada no solo para ser comparable con otros antifúngicos del mercado con las mismas indicaciones, sino también para minimizar el riesgo de resistencias.

En estudios más avanzados, esta concentración podrá ajustarse considerando los criterios farmacocinéticos y farmacodinámicos en humanos. La alta tasa de resistencia de las infecciones tópicas contra *Candida* spp., *Aspergillus* spp. y hongos dimórficos o filamentosos hace que el uso de CSP al 2% sea una opción a considerar, especialmente si la formulación puede ser estabilizada fisicoquímicamente a largo plazo.

Por otro lado, la limitada absorción sistémica observada con CSP en estudios previos (Ruiz-Camps & Cuenca-Estrella, 2009) es un factor clave para garantizar un efecto terapéutico local sin causar una exposición innecesaria al fármaco en el sistema general. Dado que su administración es bucal y no oral, la absorción sistémica es mínima, lo que reduce el riesgo de efectos secundarios incluso en concentraciones elevadas. En caso de ingestión involuntaria de pequeñas cantidades, la absorción sigue siendo insignificante, reforzando así la seguridad del tratamiento.

Se evaluó el pH de las formulaciones debido a su impacto en la estabilidad del fármaco y de la formulación. El pH óptimo para el tratamiento de la candidiasis oral oscila generalmente entre 5,50 y 7,50, ya que en este rango se reduce la adhesión de *C. albicans* a las células epiteliales bucales, lo cual contribuye a limitar su proliferación y facilita la acción de los agentes antifúngicos (Bikandi et al., 2000; Ramos-Pardo et al., 2023). Sin embargo, las respuestas individuales pueden variar, por lo que puede ser necesario ajustar

los valores según la gravedad de la infección y las características individuales del paciente. Para simular las condiciones reales de aplicación en la cavidad oral, las formulaciones se mezclaron con ASM. Tras este procedimiento y después de tres meses de almacenamiento a 4 °C, solo el hidrogel de quitosán mantuvo su pH sin cambios (Tabla 2 del artículo 2). Este hecho se atribuye a la solubilidad del quitosán, que es soluble a pH por debajo de 6 debido a la protonación de los grupos amino ($-NH_2$) en su estructura química. A pH bajos, estos grupos amino adquieren una carga positiva. Esta carga reduce las interacciones intermoleculares entre las cadenas, facilitando la solubilización (W. Wang et al., 2020).

Analizar las propiedades reológicas de un producto tópico es crucial en el desarrollo de formulaciones, puesto que influye en el proceso de producción, envasado, estabilidad física del producto, así como en su dispensación, características sensoriales y eficacia del fármaco en condiciones *in vivo* (Berenguer et al., 2020). Como se esperaba, las formulaciones a base de ASM y jarabe simple mostraron una baja viscosidad, lo que confirma su idoneidad para ser utilizadas como enjuagues bucales o ser aplicadas mediante pulverización *in situ*.

El hidrogel de quitosán mostró un comportamiento reológico típico de *shear thinning* y tixotropía, como demuestran estudios previos (Abu-Jdayil et al., 2021). Este comportamiento revela la capacidad que presenta el gel para reducir la viscosidad con el aumento de la velocidad de cizalla. Además, se observó que la viscosidad del hidrogel disminuyó con el aumento de la temperatura. Esta característica asegura una distribución uniforme durante la aplicación y favorece la formación de una película consistente, optimizando el tiempo de interacción del fármaco con el tejido afectado. Por su parte, el hidrogel de P407, exhibió un comportamiento típico de gelificación termorreversible: a temperaturas bajas se comportó como un fluido casi newtoniano, mientras que, a temperaturas más altas, aproximadamente 25°C, formó un gel. Como ya se ha comentado anteriormente, el P407 es un copolímero tribloque con un núcleo hidrofóbico de PPO y bloques hidrofílico de PEO que forman agregados micelares que estabilizan la estructura en estado gel (Galindo-Camacho et al., 2023; Soriano-Ruiz et al., 2020). Este fenómeno de gelificación térmica aumenta el tiempo de residencia del producto en el lugar de aplicación pudiendo contribuir, de este modo, a una mayor eficacia terapéutica (Galindo-Camacho et al., 2023).

Finalmente, la pasta corresponde a una formulación con una alta consistencia en comparación con las demás. La formulación presenta una elevada viscosidad, especialmente a bajas temperaturas, con un comportamiento no newtoniano y tixotrópico que favorece tanto su aplicación como su adherencia prolongada en el lugar de administración (El Moussaoui et al., 2021; Soriano-Ruiz et al., 2020). Todos estos resultados se pueden apreciar tanto en la Figura 2 como en la Tabla 3 del artículo 2.

La capacidad de propagación o extensibilidad de una muestra es un parámetro crucial en la evaluación de las formulaciones tópicas, ya que influyen tanto en la uniformidad de la dosis como en la aplicación del producto, y, por ende, en la eficacia terapéutica. Dicha capacidad se evaluó para todas las formulaciones, a excepción de los enjuagues bucales (Figura 3 del artículo 2). El hidrogel de quitosán destacó por su alta extensibilidad, lo que facilitaría su aplicación sobre la mucosa bucal, zona donde la aplicación de cualquier formulación tópica es compleja.

En las formulaciones bucales, la adhesión a la mucosa es vital, ya que la salivación y los movimientos de la lengua pueden arrastrar el producto y dificultar su permanencia en el lugar de aplicación. Las formulaciones que incluyen polímeros mucoadhesivos tienen la capacidad de poder fijarse a los tejidos mucosos, a través de sus interacciones con la mucina (Kumar et al., 2022; Vasquez-Martínez et al., 2023), lo que justifica sus propiedades adhesivas. La mucoadhesión de las formulaciones se evaluó utilizando tres enfoques distintos: medición de la viscosidad, análisis del potencial zeta y pruebas *ex vivo* de fuerza mucoadhesiva en tejido bucal y sublingual (Figura 4 del artículo 2).

Los resultados obtenidos mostraron diferencias significativas en viscosidad entre las formulaciones de estudio, destacando el hidrogel de quitosán y la pasta grasa. El aumento de la viscosidad se correlaciona con una mayor interacción entre los polímeros y las cadenas de mucina, que se unen a través de enlaces no covalentes, incrementando por tanto la capacidad de adhesión (Kumar et al., 2022; Vasquez-Martínez et al., 2023). La medida del potencial zeta (ZP) también refleja estas interacciones. Se analizaron los cambios en la carga superficial, lo cual permitió evaluar las interacciones electrostáticas entre los grupos funcionales de la mucina (carboxilatos y sulfonatos) y los polímeros mucoadhesivos presentes en las formulaciones. Las variaciones observadas reflejaron una correlación entre el ZP y la fuerza de adhesión, destacando el papel de los polímeros catiónicos como el quitosán para neutralizar las cargas negativas de la mucina y favorecer la adhesión (Gosecka & Gosecki, 2021). Finalmente, en los estudios *ex vivo* realizados para evaluar la fuerza mucoadhesiva con tejido bucal y sublingual revelaron que las formulaciones presentaron diferentes niveles de fuerza mucoadhesiva, siendo estas mayores en las muestras que contenían el hidrogel de quitosán. Este hecho demuestra nuevamente las propiedades mucoadhesivas intrínsecas del polímero (Saikia & Gogoi, 2015; Takeuchi et al., 2005). Asimismo, se observó que el tejido sublingual presentó mayores valores de fuerza comparado con el tejido bucal, lo cual podría deberse a las diferencias anatómicas y funcionales entre ambos tejidos.

La pérdida transepidérmica de agua (TEWL) es un método ampliamente reconocido para evaluar la integridad de la función de la barrera cutánea y también puede extenderse para evaluar la integridad de la barrera mucosa. La pérdida de agua transmucosa (TMWL) es una medición que puede usarse como un indicador de la función biológica de estas membranas mucosas. Aunque los valores de TMWL bucal están documentados en la

literatura (Amores et al., 2014), no se conocen estudios previos que describan los valores de TMWL sublingual, lo que convierte a nuestro estudio en el primero que aporta datos inéditos sobre los valores de TMWL sublingual, ampliando el conocimiento sobre la función de las barreras mucosas. Dichos resultados (Figura 5 del artículo 2) mostraron diferencias entre el tejido bucal y el sublingual tras la aplicación de las formulaciones durante dos horas. En la mucosa bucal, la mayoría de las formulaciones mantuvieron los valores constantes, indicando estabilidad. En la mucosa sublingual, se observó un aumento inicial en todos los casos, con tendencias variadas después de los 60 minutos. En general, los resultados sugieren que la mucosa sublingual experimenta más variabilidad en la pérdida de agua, probablemente debido a diferencias estructurales entre ambos tejidos.

La farmacoterapia puede aumentar el riesgo de problemas en la salud bucal al provocar resequedad en la mucosa oral. Se midió la hidratación de los tejidos bucal y sublingual antes y después de la aplicación de las formulaciones, durante un período de 2 horas, para evaluar los efectos sobre la humedad de las mucosas (Figura 6 del artículo 2). Según los resultados obtenidos para la mucosa bucal, ninguna de las formulaciones alteró la hidratación, ya que los valores basales permanecieron constantes durante el estudio. En contraste, en la mucosa sublingual, se observó una ligera deshidratación con todas las formulaciones, excepto con la pasta grasa. Esta pérdida de hidratación en la mucosa sublingual podría explicarse por su mayor delgadez en comparación con la mucosa bucal, lo que limita su capacidad para retener humedad, dificultando su función como barrera contra la pérdida de agua.

El perfil de liberación *in vitro* es fundamental para evaluar la eficacia del sistema de liberación de fármacos, predecir su comportamiento *in vivo* y entender los mecanismos subyacentes (Alvarado et al., 2015). Los resultados mostraron que todas las formulaciones se ajustaron al modelo cinético de primer orden (Tabla 4 del artículo 2). En este modelo, la tasa de liberación es directamente proporcional a la concentración de fármaco restante. Esto asegura una liberación rápida de la CSP, permitiendo su disponibilidad inmediata para difusión (Mallandrich et al., 2017). La evaluación de los resultados mostró que los excipientes influyen tanto en la liberación como en la permeación a través de las membranas biológicas. El hidrogel de P407 mostró ser la formulación que mayor cantidad de fármaco liberó, lo que sugiere que el fármaco no se retiene fuertemente en las micelas formadas por este polímero (Shaarani et al., 2017). Además, también se observó una relación inversa entre la viscosidad de la formulación y la liberación de CSP. A medida que aumentaba la viscosidad (hidrogel de quitosán y la pasta grasa) disminuía la tasa de liberación del fármaco. Cuanto mayor es la viscosidad, más pronunciado es el obstáculo a la difusión del fármaco, coincidiendo con los resultados obtenidos por otros investigadores (Tas et al., 2007). La elección del vehículo también influye significativamente en la liberación del fármaco. Los hidrogeles, debido a su base hidrofílica, permitieron una liberación más rápida en comparación con la pasta grasa, cuya naturaleza oleosa retrasa el

proceso (Figura 7 del artículo 2). Estos resultados coinciden con estudios previos que asocian una mayor proporción de fase oleosa con una menor liberación del fármaco (Yener et al., 2009).

La cavidad oral es una vía de administración no invasiva que puede ofrecer efectos tanto locales como sistémicos. Las infecciones fúngicas, especialmente por *Candida spp.*, colonizan la superficie mucosa, por lo que es fundamental demostrar que el efecto terapéutico es local (Zhou et al., 2021). La capa más externa de la cavidad oral está compuesta por un epitelio escamoso estratificado, mientras que la capa más interna incluye la membrana basal, la lámina propia y la submucosa, siendo mucho más permeable que la piel (Galey et al., 1976). A diferencia de esta, la mucosa oral es altamente vascularizada. Esta alta permeabilidad, junto con factores como la deglución y la salivación, puede dificultar la retención del medicamento en la mucosa y favorecer su eliminación antes de ejercer su efecto terapéutico (Martin et al., 2003; Patel et al., 2011). Por ello, para optimizar la acción local del fármaco en las mucosas bucal y sublingual, es crucial formular sistemas que prolonguen su tiempo de residencia en el lugar de aplicación y minimicen su absorción sistémica.

Hasta donde se tiene conocimiento, no existen estudios previos que analicen los parámetros de permeabilidad de la CSP a través de la mucosa bucal y sublingual porcina, lo que resalta la novedad de este estudio en cuanto a la evaluación de la difusión de este fármaco en modelos *ex vivo* de tejidos orales. En este estudio, se observó que la CSP se retiene en los tejidos, favoreciendo el efecto local sin riesgo de alcanzar niveles terapéuticos sistémicos (Tabla 5 del artículo 2). A pesar de que la mucosa sublingual, debido a su menor grosor (entre 100 y 200 μm frente a los 500-800 μm de la mucosa bucal) (Guo & Pratap Singh, 2019), podría haber presentado mayor permeabilidad a CSP, los resultados obtenidos no siguieron esta tendencia en todos los casos (Figura 8 del artículo 2). Por ejemplo, el hidrogel de quitosán mostró mayores valores de flujo y coeficiente de permeabilidad en comparación con otras formulaciones, sugiriendo que las propiedades fisicoquímicas de CSP y la interacción con las mucosas influyen en la difusión, más allá de la simple diferencia de grosor entre las mucosas bucal y sublingual (Dodane et al., 1999).

Además, el coeficiente de partición parece desempeñar un papel importante en la difusión de CSP a través de los tejidos, probablemente debido a diferencias estructurales entre ambas mucosas. Se observaron también diferencias en el tiempo de retraso (lag time) entre las mucosas bucal y sublingual, especialmente para la pasta grasa, que requiere más tiempo en la mucosa sublingual para alcanzar el estado estacionario y, por ende, una tasa constante de permeación. El hidrogel de quitosán mostró la mayor cantidad de fármaco retenido en ambos tejidos, lo que sugiere que esta es la mejor formulación para dirigir el fármaco hacia el tejido y promover una acción local.

Los enjuagues bucales no fueron incluidos en los ensayos debido a que la deglución y la acción de la saliva dificultan la retención y penetración del fármaco en los tejidos orales. Este factor limita la capacidad de evaluar la permeabilidad y la eficacia del fármaco a través de la mucosa de forma controlada.

Los hallazgos histológicos pusieron de manifiesto los efectos de las formulaciones en el epitelio mucoso. El enjuague de ASM y el hidrogel de P407 no mostraron daños, mientras que el enjuague de jarabe y la pasta grasa indujeron alteraciones, sugiriendo posibles efectos adversos. El hidrogel de quitosán afectó de manera diferente la mucosa bucal y sublingual (Figuras 10 y 11 del artículo 2), destacando la importancia de evaluar los impactos específicos en distintas áreas de la mucosa oral. Además de las diferencias de grosor (Guo & Pratap Singh, 2019), los tejidos bucal y sublingual presentan variaciones en su composición celular. El tejido bucal contiene principalmente tejido conectivo y músculos estriados, con epitelio escamoso estratificado no queratinizado, mientras que el sublingual está compuesto principalmente por células epiteliales glandulares productoras de saliva (Ibáñez-Cortés et al., 2023). El estudio histológico se llevó a cabo en tejidos de mucosa bucal y sublingual porcinas tras 6 horas de exposición a las formulaciones, un período que corresponde al tiempo de exposición utilizado en el ensayo previo de permeación, el cual no necesariamente refleja el tiempo de aplicación real de las formulaciones bucales. Estos análisis ofrecen una visión de los posibles daños causados por las formulaciones. Aunque los resultados *ex vivo* indican que la mayoría de las formulaciones pueden inducir alteraciones en el epitelio, se requieren estudios *in vivo* para validar estos hallazgos y comprobar si se observan resultados similares en organismos vivos. Comprender los efectos de las formulaciones en las diferentes regiones de la mucosa oral es crucial para el desarrollo de tratamientos seguros y efectivos.

Por último, el estudio de eficacia antimicrobiana demostró que las formulaciones cargadas con CSP son efectivas contra las diferentes especies de *Candida spp.* probadas, produciendo amplias zonas de inhibición que confirman la eficacia de los productos desarrollados (Tabla 6 del artículo 2). A pesar de que *C. auris* mostró una fuerte inhibición a las 24 horas de incubación, a las 48 horas presentó un pequeño crecimiento resistente en el área inicial de inhibición, lo que indica que las formulaciones no son tan efectivas para eliminar esta cepa. Sin embargo, las formulaciones sí demostraron efectividad contra cuatro de las especies de *Candida* probadas, demostrando que podrían ser útiles en el tratamiento de la candidiasis oral.

5.3. Formulaciones vaginales

La candidiasis vulvovaginal es una infección frecuente que afecta a la salud genital femenina y a la calidad de vida de quienes la padecen. Se presenta con síntomas como prurito, flujo vaginal espeso y eritema vulvar. Aunque los tratamientos actuales, como

clotrimazol y fluconazol, son efectivos en la mayoría de los casos, presentan limitaciones frente a infecciones por especies no *albicans* como *C. glabrata* o *C. krusei*.

Con el objetivo de superar las limitaciones de los tratamientos actuales, se desarrollaron tres formulaciones con CSP al 2% para enriquecer el arsenal terapéutico disponible para el tratamiento de la candidiasis vulvovaginal. Estas incluyeron un **hidrogel de chitosán al 2%**, conocido por su propiedades mucoadhesivas y antimicrobianas; **otro de P407 al 20%**, polímero capaz de cambiar de estado líquido a gel a la temperatura corporal; y un tercer **hidrogel que combina las propiedades de los polímeros chitosán al 2% y P407 al 20%**, ofreciendo un equilibrio entre adherencia, estabilidad y liberación controlada del fármaco (sección 4.2 del artículo 3). Se llevó a cabo una caracterización detallada de todas las formulaciones, para confirmar su idoneidad para la administración tópica.

El valor de pH es crucial para garantizar una buena compatibilidad con el entorno vaginal, puesto que alteraciones en este valor pueden comprometer tanto la eficacia del tratamiento como la seguridad del paciente. Un valor de pH adecuado en las formulaciones vaginales ayuda a mantener el equilibrio de la microbiota vaginal. Tras un periodo de almacenamiento de tres meses a 4°C, ninguno de los valores de pH sufrió cambios significativos. Para simular las condiciones de aplicación, las formulaciones se mezclaron con fluido vaginal simulado (SVF) cuya composición y pH fueron ajustados para imitar el entorno vaginal (Aka-Any-Grah et al., 2010; Falavigna et al., 2020). Tras esto, el hidrogel de chitosán y el que combina los polímeros mantuvieron su pH estable, mientras que el hidrogel de P407 experimentó una ligera disminución de los valores.

El pH vaginal, que normalmente se encuentra alrededor de 4,50, puede alterarse durante una infección, llegando a alcanzar valores que rondan la neutralidad (Cook & Brown, 2018; Falavigna et al., 2020). En este contexto, todos los geles presentaron valores compatibles con el rango fisiológico del pH vaginal, lo que pone de manifiesto que todas serían adecuadas para el tratamiento vaginal.

Utilizando la Microscopía Electrónica de Barrido (SEM) se analizó la microestructura de los hidrogeles desarrollados, lo que permitió observar diferencias significativas en su morfología (Figura 1 del artículo 3). El hidrogel de chitosán mostró una estructura uniforme, lo que revela un control morfológico eficiente durante su formulación y asegura una matriz estable para la liberación del fármaco. Por otro lado, el gel de P407 presentó una alta porosidad, característica que podría facilitar la difusión del fármaco y mejorar la capacidad de absorción de fluidos, cualidad especialmente valiosa en entornos que requieren una interacción intensa con fluidos biológicos (Chatterjee & Hui, 2019). En el caso del gel combinado, se observó una red porosa más definida que indica una interacción sinérgica entre ambos polímeros. Esto no solo optimiza las propiedades mecánicas del hidrogel, sino que también podría mejorar la biodisponibilidad del fármaco. Se ha observado que las estructuras porosas pueden favorecer una mayor superficie de contacto con los fluidos

biológicos, lo que facilita la disolución y difusión del principio activo, un efecto previamente descrito en otros materiales diseñados para mejorar la liberación de fármacos (Baumgartner & Planinšek, 2021). La disposición del chitosán entre las micelas del poloxámero parece influir en esta interacción, creando una configuración que modula el perfil de liberación del principio activo (W. Y. Wang et al., 2016). Además, las imágenes de SEM demostraron que no había cristales de fármaco en la superficie de las formulaciones, indicando que la CSP se incorporó de manera uniforme a la matriz de los geles. Este hallazgo refuerza la calidad y consistencia de los sistemas.

La carga superficial de las formulaciones juega un papel para evaluar la estabilidad, solubilidad y distribución del fármaco en las formulaciones (Shaarani et al., 2017). El análisis de ZP (Tabla 1 del artículo 3) puso de manifiesto que cada hidrogel posee un perfil de carga distintivo que podría influir en su interacción con los tejidos y su estabilidad física. Los resultados indican que la incorporación de CSP en la formulaciones no produjo cambios significativos en los valores de ZP ($p < 0,05$). Esto sugiere que la CSP se distribuyó uniformemente en la matriz de cada formulación, lo que es crucial para mantener la estabilidad coloidal de los hidrogeles. El gel de chitosán mostró valores de carga positivos, lo que se atribuye a la presencia de grupos amino protonados en su estructura. Por otro lado, el hidrogel de P407 presentó valores de carga más bajos, lo que puede estar relacionado con su naturaleza no iónica. En el caso del hidrogel combinado, los valores obtenidos fueron intermedios, lo que sugiere una interacción entre ambos componentes que modula la carga superficial de la formulación. Además, la distribución homogénea de la CSP en los hidrogeles sugiere que estos sistemas son adecuados para la administración del fármaco.

El comportamiento reológico influye directamente en la estabilidad de las formulaciones, la percepción durante su aplicación, la facilidad con la que se extienden sobre la superficie y la precisión en la dosificación. Todas estas propiedades son atributos esenciales para el desarrollo de sistemas de administración tópica (Berenguer et al., 2020; Chejara et al., 2013; Y. Liu et al., 2017). El análisis reológico de las formulaciones reveló diferencias en cuanto al comportamiento, relacionadas directamente con la naturaleza de los polímeros. Tanto el gel de chitosán como el que combinaba ambos polímeros presentaron un comportamiento no newtoniano, ajustándose a un perfil pseudoplástico con características tixotrópicas (Tabla 2 y Figura 2 del artículo 3). Este comportamiento permite la formación de una película uniforme y estable sobre la superficie de aplicación que facilita la difusión del fármaco y la administración mediante cánula. Además, la alta viscosidad del gel de chitosán sugiere una estructura más robusta, capaz de mejorar la adherencia a la mucosa vaginal y favorecer la retención del fármaco (Acosta et al., 2015; Berenguer et al., 2020; Sanz et al., 2018). Por otro lado, el gel de P407 mostró un comportamiento termorreversible. Este cambio de solución a gel facilitaría la administración en estado líquido y garantizaría una buena retención tras la gelificación *in situ* en el entorno vaginal.

Sin embargo, su menor viscosidad en comparación con las formulaciones que contienen chitosán podría reducir la capacidad de mantenerse en el lugar de acción.

La combinación de chitosán y P407 parece ofrecer un equilibrio entre las propiedades de ambos polímeros, como se observa en los estudios de ZP. El perfil reológico observado indica que la incorporación del chitosán al sistema de P407 modifica la interacción entre las cadenas poliméricas, incrementando la viscosidad aparente y disminuyendo la temperatura de transición de líquido a gel (Bansal et al., 2018; Desai et al., 2001). Aunque no se ha estudiado en detalle la naturaleza exacta de esta interacción, se podrían prever algunas ventajas como mejor capacidad mucoadhesiva, lo que contribuye a controlar la liberación y retención del fármaco en el sitio de aplicación (Desai et al., 2001; Giuliano et al., 2018).

La extensibilidad es una propiedad clave en las formulaciones de aplicación tópica, ya que influye directamente en el proceso de envasado, en la uniformidad de dosis y en la facilidad de aplicación, todos factores determinantes para obtener una buena respuesta terapéutica (Brugués et al., 2015; Sanz et al., 2018). En este estudio, los sistemas desarrollados mostraron valores de extensibilidad mayores a la muestra de referencia, Gine-Canestén®, 20 mg/g, lo que sugiere que tanto la aplicación como la cobertura sobre la superficie mucosa se llevan a cabo con éxito. Entre las formulaciones evaluadas, el hidrogel que combina ambos polímeros mostró una mayor extensibilidad, seguido por el hidrogel de chitosán y el hidrogel de P407. La muestra de referencia, por su parte, presentó una extensibilidad notablemente menor (Figura 3 del artículo 3). Estas diferencias destacan al hidrogel combinado, ya que su mayor extensibilidad facilita una aplicación uniforme en la mucosa vaginal. Además, la termosensibilidad que presentó le permite mantenerse en estado líquido durante la aplicación y se convierte en gel a la temperatura corporal, facilitando la penetración en los pliegues más profundos de la mucosa vaginal y prolongando la retención de la CSP. Esta característica es especialmente relevante para el tratamiento localizado y sostenido de infecciones vaginales, ya que puede contribuir a una mayor eficacia terapéutica y a una reducción en la frecuencia de administración.

La extrusión es un parámetro crucial en preparaciones destinadas a la administración vaginal, ya que determina la facilidad con la que el producto puede ser dispensado a través un aplicador. Los aplicadores vaginales habitualmente son tubos huecos con un lumen superior al de una jeringa, por lo que es esencial que la formulación pueda ser expulsada con el mínimo esfuerzo (Sanz et al., 2018). En los resultados obtenidos (Tabla 3 del artículo 3) se puede observar que el hidrogel que se extruye con mayor facilidad es el que está compuesto por P407. No obstante, posibles derrames durante el proceso de administración podrían afectar la dosis efectiva. En cambio, la muestra de referencia necesitó una fuerza superior a la del resto para su extrusión. Por otro lado, el hidrogel combinado demostró tener mejores cualidades para la extrusión que el hidrogel de chitosán. La combinación de polímeros, nuevamente parece destacar sobre las demás

formulaciones, ofreciendo un equilibrio adecuado entre facilidad de uso y el control durante la administración.

Determinar las propiedades mucoadhesivas es otro aspecto fundamental en el desarrollo de formulaciones vaginales, ya que el proceso natural de autolimpieza de esta cavidad puede reducir el tiempo de permanencia de los preparados en la mucosa. La mucoadhesión de los geles de CSP se evaluó mediante el análisis de los valores de ZP de mezclas de hidrogel-mucina utilizando una solución al 1% de mucina como referencia. Los resultados mostraron cambios significativos en los valores, lo que sugiere una interacción electrostática entre los grupos negativos de la mucina, como carboxilato (COO^-) y sulfonato (SO_3^-), con los grupos positivos presentes en los polímeros utilizados (Gosecka & Gosecki, 2021). Estas interacciones permiten la neutralización de la carga de la mucina, una característica clave de los polímeros mucoadhesivos (Takeuchi et al., 2005). En este caso, el hidrogel de quitosán confirmó sus propiedades mucoadhesivas, atribuibles a su naturaleza catiónica (Saikia & Gogoi, 2015), al mostrar el mayor desplazamiento en el valor ZP (Figura 5 del artículo 3). Este comportamiento sugiere que establece interacciones electrostáticas fuertes con los grupos negativos de la mucina, favoreciendo una mayor retención de la formulación en la mucosa. El gel combinado mostró propiedades mucoadhesivas superiores al gel de P407 solo, pero ligeramente inferiores al gel de quitosán. Esto se debe a que el P407 no posee propiedades mucoadhesivas por sí mismo, pero en combinación con el quitosano, mejora parcialmente la capacidad mucoadhesiva del sistema. Sin embargo, el gel de quitosán sigue siendo el que muestra la mayor interacción con la mucina, lo que favorece su mayor retención en la mucosa.

Los perfiles de liberación mostraron diferencias significativas en cuanto a la cantidad de CSP liberada, la velocidad a la que se libera y el comportamiento cinético (Figura 6 del artículo 3). El hidrogel de P407 destacó por ser el que liberó mayor cantidad de fármaco, atribuible a sus propiedades micelares que facilitan una excelente solubilidad (Domínguez-Delgado et al., 2016). En segundo lugar, se encuentra el hidrogel combinado y, finalmente el hidrogel de quitosán. Los resultados del ajuste mostraron diferentes perfiles de liberación. El hidrogel de quitosán y el combinado se ajustaron a un modelo cinético Fickiano, mientras que el hidrogel de P407 se ajustó a un modelo sigmoideal.

Al evaluar parámetros biofarmacéuticos como el tiempo medio de disolución, el área bajo la curva y la eficiencia de liberación, se observó que el hidrogel que combina quitosán y P407 presentó el tiempo medio de disolución más corto, lo que se traduce en una liberación más rápida de la CSP (Figura 7 del artículo 3). Además, este hidrogel mostró la mayor eficacia de liberación, lo que sugiere una mejor capacidad para liberar y distribuir la CSP dentro de la matriz, probablemente debido a su estructura porosa interconectada.

La administración vaginal puede proporcionar un efecto terapéutico localizado, esencial para el tratamiento de infecciones fúngicas como las causadas por *Candida* spp.,

que colonizan la superficie de la mucosa (Zhou et al., 2021). En este contexto, los estudios de permeación y retención de CSP en la mucosa vaginal (Figura 8 y Tabla 4 del artículo 3) ponen de manifiesto que estas propiedades están influenciadas por la formulación de los hidrogeles. La mucosa vaginal, siendo una barrera semipermeable, permite una absorción selectiva que va a depender tanto de las propiedades fisicoquímicas del fármaco como de las características de la matriz polimérica de la formulación.

El hidrogel combinado, a pesar de mostrar un perfil de permeación más bajo, fue el que más CSP retuvo en el tejido vaginal, lo que sugiere que la combinación de quitosán y P407 no solo modula la penetración del principio activo, sino que también mejora su retención, prolongando el efecto terapéutico. Estudios previos han destacado el papel del quitosán en la interacción con las uniones estrechas del epitelio, facilitando por tanto la retención del fármaco en la superficie mucosa (Dodane et al., 1999; Gosecka & Gosecki, 2021). Por otro lado, el P407, debido a sus propiedades surfactantes, también puede actuar como potenciador de la permeación (Bodratti & Alexandridis, 2018; Dumortier et al., 2006). Curiosamente, el bajo perfil de permeación observado en la formulación que combina quitosán y P407 es ventajoso para prevenir la absorción sistémica de la CSP y minimizar así los posibles efectos secundarios. Esto concuerda con las concentraciones plasmáticas en estado estacionario (C_{ss}), que se mantuvieron por debajo de los niveles terapéuticos sistémicos en todas las formulaciones. Este equilibrio entre la permeación y retención de la CSP es crucial para la terapia local, ya que una absorción sistémica excesiva podría llevar a toxicidad, mientras que una retención insuficiente en los tejidos podría disminuir la eficacia terapéutica.

El análisis histológico del tejido vaginal (Figura 9 del artículo 3) reveló diferencias significativas en la estructura del epitelio estratificado no queratinizado, lo que refleja el impacto de los tratamientos administrados. Bajo condiciones de control negativo, el epitelio vaginal mantuvo su estructura intacta, con aproximadamente 6–7 capas celulares, lo que es característico de una mucosa vaginal saludable. En cambio, bajo condiciones de control positivo, se pudo observar una contracción del epitelio, reflejando el efecto irritante sobre esta. Tras el tratamiento con los geles que contenían quitosán, se observó que se mantenía el grosor del epitelio, por lo que estas formulaciones parecen ser seguras para la mucosa vaginal. En cambio, el gel de P407 indujo la pérdida de algunas capas externas del epitelio, posiblemente debido a una reducción en la cohesión celular de las capas más superficiales o a efectos deshidratantes del hidrogel durante el procesamiento. Este estudio se ha realizado con tejido *ex vivo* tras 6 horas de exposición a las formulaciones, sin tener en cuenta las condiciones reales de aplicación, donde la constante humedad y las secreciones naturales podrían alterar los resultados. A pesar de que las formulaciones conservan, en su mayoría, la integridad del tejido, se requieren estudios *in vivo* para validar estos hallazgos en condiciones fisiológicas más realistas, lo que permitirá evaluar mejor la seguridad y eficacia de las formulaciones en un entorno biológico completo.

Finalmente, se realizó un estudio de eficacia antimicrobiana con el objetivo de demostrar la actividad antifúngica de las formulaciones frente a diversas especies de *Candida*. Todas las formulaciones con CSP demostraron una actividad antimicrobiana eficaz contra cuatro de las cinco especies de *Candida* que se testaron, respaldando su potencial como opciones terapéuticas para el tratamiento de la candidiasis vulvovaginal. Por otro lado, algunas formulaciones sin CSP, también mostraron cierta capacidad para inhibir el crecimiento de las levaduras. Este hallazgo pone de manifiesto que la incorporación de quitosán, conocido por su actividad antimicrobiana, contribuye a la prevención del desarrollo fúngico, aunque su eficacia parece depender de las propiedades fisicoquímicas de la formulación, como se ha observado en estudios previos (Abilova et al., 2020; Raafat et al., 2008; Raafat & Sahl, 2009). La resistencia observada en *C. auris* después de 48 h indica que esta cepa presenta una mayor tolerancia al tratamiento, lo que podría requerir estrategias adicionales para su eliminación efectiva.

5.4. Formulaciones tópicas

La candidiasis cutánea es una infección fúngica superficial que afecta la integridad de la piel, especialmente en áreas húmedas y con pliegues como las axilas, ingles y debajo de los senos. Se manifiesta con lesiones eritematosas, pruriginosas y húmedas, acompañadas de pústulas satélite. Factores como la diabetes y la inmunosupresión aumentan el riesgo de recurrencias y complican el tratamiento. Este varía según la gravedad, desde antifúngicos tópicos como clotrimazol y miconazol en infecciones leves, hasta fluconazol sistémico en casos graves o recurrentes, destacando la importancia de controlar factores subyacentes.

Sin embargo, las limitaciones de las terapias actuales subrayan la necesidad de desarrollar nuevas formulaciones y enfoques terapéuticos más específicos, capaces de mejorar la eficacia, reducir la resistencia fúngica y optimizar la administración del tratamiento. Por ello, se formularon dos hidrogeles con un 2% de CSP (Tabla 1 del artículo 4). El primer gel consistió en una mezcla de **chitosán y P407 al 2 y 18%**, respectivamente. El segundo gel incluyó, además del **chitosán y el P407**, dos promotores de la permeación: **Azona y Transcutol-P, ambos al 5%**.

Las formulaciones desarrolladas mostraron una apariencia uniforme y homogénea, sin partículas visibles, grumos ni precipitados (Figura 3 del artículo 4). Estos atributos físicos son fundamentales para garantizar una apariencia estética agradable y una textura suave, lo que mejora la aceptación por parte del paciente y asegura el cumplimiento terapéutico.

Tanto el quitosán como el P407 contribuyen a la formación del gel, proporcionando no solo la estructura necesaria, sino que también aportan propiedades termorreversibles

cruciales para su uso terapéutico. En este caso, y como ya se ha comentado anteriormente, P407 actúa como el principal responsable de la formación de micelas en solución acuosa cuando su concentración supera la CMC. En este caso, una concentración del 18% fue suficiente para inducir la formación de las micelas, donde las interacciones hidrofóbicas entre los grupos PPO favorecen la formación del núcleo interno de las micelas, mientras que las interacciones hidrofílicas de los grupos PEO con el agua generan la corona externa (Mfoafo et al., 2022; Soliman et al., 2019). La capacidad de autoorganización del P407 permite que las micelas se empaqueten formando una estructura de gel a concentraciones específicas, 18% en este caso (Zarrintaj et al., 2020). El chitosán por su parte, contribuye a la formación del gel mediante un mecanismo de entrecruzamientos físico, donde las interacciones iónicas y los enlaces de hidrógeno actúan como fuerzas impulsoras para la formación de redes entrelazadas (Ahmadi et al., 2015; Sacco et al., 2018). Estas interacciones pueden ayudar a fortalecer la estructura y mejorar la capacidad de retención del principio activo (Figura 4 del artículo 4).

Aunque la gelificación se deba principalmente a estas interacciones entre los componentes, la temperatura también juega un papel relevante a la hora de determinar las propiedades finales de los geles. En cuanto a las propiedades termorreversibles, los resultados muestran que la incorporación de los promotores Azona y Transcutol-P no alteró la sensibilidad térmica, como puede observarse en la Figura 5 del artículo 4. Con el incremento de la temperatura, los geles mostraron una mayor fluidez; sin embargo, no se alcanzó una gelificación completa. Este hecho puede atribuirse a la interacción de las cadenas de chitosán con las cadenas PEO del P407, que provoca un aumento en el grosor de la corona micelar, por el incremento de cadenas hidrofílicas interconectadas, y eleva la viscosidad aparente del gel, lo que facilita una transición solución-gel a temperaturas más bajas de las esperadas en un sistema simple de P407 (Desai et al., 2001; W. Y. Wang et al., 2016). Además, la incorporación de CSP a los diferentes sistemas tampoco alteró la sensibilidad a la temperatura (Figura 5 del artículo 4).

El análisis mediante FTIR permitió identificar posibles interacciones entre el principio activo y la matriz de los geles. En la Figura 6 del artículo 4, se muestran los espectros correspondientes a los geles con y sin CSP. Los picos característicos de los grupos funcionales de la CSP, como el grupo carbonilo y amida, se observaron alrededor de 1600 cm^{-1} . Además, en el rango comprendido entre 3200 y 3600 cm^{-1} se identificaron picos asociados a los grupos hidroxilos y amida pertenecientes a la estructura del fármaco (Figura 6 del artículo 4). Al comparar los espectros de los hidrogeles con el principio activo con el espectro de la CSP en su forma libre, se observó una disminución considerable dentro del rango comprendido entre los 3000 y los 3600 cm^{-1} (OH stretching). Esta disminución sugiere la formación de puentes de hidrógeno entre los grupos hidroxilo de la CSP y los polímeros que conforman la matriz de los geles, como el chitosán. Dado que estas interacciones son físicas y no químicas, no implican la formación de enlaces covalentes

que alteren la estructura del fármaco ni afecten su eficacia. Los resultados coinciden con estudios previos que han descritos interacciones similares en sistemas poliméricos cargados con fármacos hidrofílicos (Mfoafo et al., 2022; Soliman et al., 2019).

Además de contribuir a la estabilidad del sistema gelificado, la formación de enlaces de hidrógeno también puede influir en la liberación controlada del fármaco, ya que la fuerza de estas interacciones puede modular la velocidad de difusión de la caspofungina desde la matriz polimérica (Ahmadi et al., 2015; Sacco et al., 2018). Esta interacción, además, podría explicar en parte, la estabilidad observada en las propiedades termorreversibles de los sistemas.

El estudio morfológico a través de SEM permitió analizar la estructura de las formulaciones con y sin CSP después de su desecación. A través de las imágenes (Figura 7 del artículo 4) se pudo observar que el hidrogel sin promotores tiene una estructura más densa y compacta. Por su parte, el hidrogel con promotores presentó una estructura más redondeada, mucho más evidente cuando no hay CSP. La incorporación de Azona y Transcutol-P parece influir en la organización de la matriz polimérica durante el proceso de gelificación (Raina et al., 2022), dando lugar a estas diferencias estructurales. Estas modificaciones en la morfología ayudarían a entender los cambios observados en las propiedades físicas, como la porosidad y el perfil de liberación del fármaco.

La porosidad se determinó mediante la densidad de absorción del solvente a los hidrogeles cargados con CSP. Los resultados mostraron que la porosidad del hidrogel con promotores fue aproximadamente cuatro veces mayor que la del hidrogel sin promotores (Tabla 2 del artículo 4). La estructura más densa y compacta del gel sin promotores podría limitar de manera parcial la liberación del fármaco, ya que una matriz más cerrada ofrece una mayor resistencia al paso del principio activo. Por el contrario, la estructura más abierta y porosa del gel con promotores facilitaría una mayor difusión del fármaco. Estos hallazgos coinciden con los resultados obtenidos tras los estudios de liberación, donde el gel con promotores mostró una liberación significativamente mayor de CSP que el que no llevaba Azona y Transcutol-P. No obstante, este tema será abordado con mayor detalle en los próximos apartados del documento.

El comportamiento reológico, como se ha mencionado en múltiples ocasiones, es un parámetro crítico en la formulaciones tópicas, ya que no solo influye en la facilidad de aplicación y en la percepción del usuario, sino también en parámetros biofarmacéuticos clave, como la liberación del fármaco desde su vehículo (Espinoza et al., 2022). Tras el estudio, se pudo observar como el hidrogel con promotores mantuvo una viscosidad superior a la del hidrogel sin promotores en todas la temperaturas evaluadas (Figura 8 del artículo 4). La mayor viscosidad observada en el gel con promotores, no solo podría favorecer un mayor tiempo de residencia sobre la superficie de aplicación, sino que también podría optimizar el perfil de liberación de la CSP, asegurando una dosificación más

controlada. La Figura 8 también muestra cómo la viscosidad de ambos geles disminuye progresivamente a medida que aumenta la temperatura. Este comportamiento difiere del patrón típico de los sistemas termosensibles. En este sentido, la incorporación de chitosán al sistema de P407 ha demostrado alterar las interacciones poliméricas, aumentando la viscosidad y reduciendo la temperatura de transición de líquido a gel (Bansal et al., 2018; Desai et al., 2001). Sin embargo, a temperaturas más elevadas de 32°C, la viscosidad del sistema podría reducirse debido a la interrupción parcial de las interacciones físicas entre las cadenas poliméricas y a la mayor movilidad de las moléculas en el hidrogel. Este hecho pone de manifiesto que el gel con Azona y Transcutol-P podría mejorar la permanencia en la superficie de aplicación, lo que a su vez favorecería la liberación sostenida del fármaco.

Ambas formulaciones se ajustaron a un comportamiento pseudoplástico (Tabla 3 del artículo 4), como se describe en el modelo de Cross, tanto en la fase de incremento de tensión (stretch ramp-up) como en la de disminución de tensión (stretch ramp-down). Este comportamiento es característico de sistemas donde la viscosidad disminuye con el aumento de la velocidad de cizalla, facilitando así su extensión sobre la piel. Cuando el gel se aplica mediante movimientos mecánicos, como en un masaje o con una ligera fricción, la viscosidad disminuye, permitiendo una distribución uniforme sobre la superficie tratada. Una vez que la fricción cesa, el hidrogel recupera su viscosidad original, lo que favorece el tiempo de residencia del producto en la zona de aplicación (Berenguer et al., 2020).

Este tipo de comportamiento es particularmente ventajoso en formulaciones de aplicación tópica, ya que proporciona al producto una buena manejabilidad y una adecuada adhesión a la piel, mejorando la experiencia del usuario y asegurando que la formulación permanezca en el lugar de aplicación el tiempo suficiente para lograr su efecto terapéutico. Además, la resistencia al flujo en estado de reposo reduce el riesgo de desplazamiento involuntario de la formulación, optimizando, de este modo, la efectividad del tratamiento.

Tanto la reología como la extensibilidad son factores esenciales en las formulaciones tópicas, ya que ambas determinan tanto la facilidad de aplicación como la distribución uniforme del fármaco, influyendo directamente en la eficacia terapéutica (Brugués et al., 2015). Al evaluar las propiedades de extensibilidad de los geles, se observó que ambos siguen un comportamiento que se ajustó a un modelo de unión de un solo sitio (Figura 9 del artículo 4) y presentaron valores similares en términos de extensibilidad (Tabla 4 del artículo 4), lo que indica que ambas formulaciones responden de forma predecible y consistente bajo condiciones de aplicación similares. Estos resultados reflejan que tanto el hidrogel sin promotores como el hidrogel con Azona y Transcutol-P se pueden distribuir uniformemente sobre la piel sin necesidad de aplicar una fuerza excesiva durante su uso. Este hecho es particularmente útil en aplicaciones clínicas donde se busca minimizar la fricción sobre zonas sensibles o inflamadas. Además, la facilidad con la que ambas formulaciones se pueden extender facilita una aplicación uniforme sobre la superficie cutánea.

Los estudios de liberación *in vitro* con células de Franz permitieron evaluar la cantidad de CSP que se liberó de las diferentes formulaciones. El perfil de liberación obtenido, se ajustó para ambos geles a un modelo de asociación exponencial de una fase o de liberación de primer orden (Figura 10 del artículo 4). Este modelo describe la liberación como un proceso dependiente de la concentración del fármaco en el compartimento donante, donde la velocidad de liberación es inicialmente rápida debido a la alta concentración de CSP en las formulaciones, seguida de una disminución progresiva a medida que se va reduciendo la concentración del principio activo en el compartimento donante.

Los resultados mostraron que, aunque el gel sin promotores liberaba el fármaco más rápidamente, el gel con promotores liberó una cantidad total de CSP mayor. Esto sugiere que la incorporación de Azona y Transcutol-P mejora la disponibilidad de la CSP y favorece una mayor liberación del fármaco en la superficie de aplicación. Por tanto, el gel con promotores podría ser más efectivo para aplicaciones tópicas al permitir una mayor absorción cutánea y eficacia terapéutica.

Los estudios de permeación juegan un papel crucial en el desarrollo y optimización de formulaciones tópicas, ya que permiten determinar cómo un fármaco puede penetrar las barreras de la piel y llegar a su lugar de acción, ya sea en la superficie cutánea o en los tejidos más profundos. La piel, como barrera protectora, dificulta la absorción de principios activos, haciendo necesario analizar cómo los fármacos interactúan con sus componentes. Estos estudios proporcionan información sobre parámetros cruciales para predecir la eficacia y seguridad de formulaciones tópicas como son el flujo, la cantidad de fármaco permeado y la velocidad de difusión. Evaluar la permeabilidad de las formulaciones es esencial para diseñar tratamientos eficaces, especialmente en terapias locales y manejo de infecciones fúngicas cutáneas.

En este tipo de ensayos es fundamental garantizar la integridad de la piel *ex vivo*, ya que el uso de piel dañada o con funciones de barrera alteradas afecta significativamente los resultados de permeabilidad. En este sentido, la evaluación de la integridad de la piel se realizó a través del parámetro TEWL, un método comúnmente utilizado para esta finalidad. En este estudio, solo se utilizaron discos de piel con valores de TEWL inferiores a 13 g/m²/h para garantizar que la integridad de la barrera cutánea se mantuviera constante y los resultados fueran representativos de la permeación en piel intacta (Dey et al., 2015).

Los resultados de permeación de la CSP se presentan en la Figura 11 del artículo 4, mostrando las cantidades de CSP que atravesaron la piel y las que quedaron retenidas al final del experimento. El perfil de permeación obtenido para ambos geles mostró cantidades similares de CSP en la mayoría de los puntos de muestreo, aunque el gel con promotores mostró una mayor retención del principio activo a las 28 horas, lo que puede atribuirse a la presencia de Azona y Transcutol-P. La Azona actúa como un potenciador de la penetración

al aumentar la fluidez de los lípidos de la piel y desorganizar la bicapa lipídica, lo que facilita la permeación tanto de fármacos hidrofílicos como lipofílicos (Kulkarni & Shaw, 2016). Mientras tanto, el Transcutol-P se utiliza comúnmente en formulaciones tópicas y orales para mejorar la solubilidad de fármacos poco solubles, a la vez que mejora su permeación, alterando el estrato córneo de la piel (Mohammadi-Meyabadi et al., 2022; Osborne & Musakhanian, 2018).

En la Tabla 5 del artículo 4, se pueden observar los parámetros típicos de permeación para las formulaciones estudiadas. A pesar de que la cantidad total de CSP permeada fue ligeramente mayor en el gel con promotores, no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre las formulaciones. El flujo, que corresponde a la velocidad de permeación del fármaco, mostró un valor de 1,50 veces mayor para el gel sin promotores, lo que indica que la CSP atraviesa la piel más rápido cuando está formulada en la matriz sin promotores. Este resultado es interesante para la terapia local, ya que la inclusión de Azona y Transcutol-P parece restringir la permeación del principio activo, promoviendo su retención en la piel.

Este patrón también se observó en los parámetros de tiempo de retraso (T_1) y coeficiente de permeación (K_p), que fueron 1,50 veces mayores para el gel sin promotores. Un T_1 más corto predice un inicio más rápido de la acción terapéutica; por lo tanto, se espera que el gel con promotores inicie su acción terapéutica más rápidamente que el gel sin promotores. El valor de K_p también fue mayor para el gel sin promotores, lo que resulta lógico, ya K_p se estima a partir del flujo, y este gel presentó un flujo mayor. Un valor de K_p más alto indica una mayor permeación del fármaco hacia el fluido receptor. Este comportamiento sugiere que el gel sin promotores puede facilitar una mayor permeación sistémica, mientras que el gel con promotores optimiza la retención para aplicaciones tópicas localizadas.

La permeación de los fármacos depende tanto de los procesos de partición como de difusión. Al analizar dichos coeficientes, se observó que la partición tiene un impacto mayor en la permeación de la CSP, ya que presenta valores más altos que el coeficiente de difusión. Curiosamente, la adición de Azona y Transcutol-P incrementa el coeficiente de partición de la CSP entre la formulación y la piel, respecto al gel sin los promotores, mientras que disminuye la difusión del fármaco a través de la piel, lo que resulta en una mayor retención en la piel. Este fenómeno también se observa al analizar la C_{ss} , donde se anticipaba un valor más bajo en el gel con Azona y Transcutol-P, lo cual fue confirmado en los resultados obtenidos. Esto refuerza la idea de que esta formulación es más adecuada para su aplicación tópica local, minimizando la permeación sistémica. C_{ss} se estimó considerando el aclaramiento plasmático de caspofungina en humanos (9.42 L/h) y una superficie de aplicación de 5 cm².

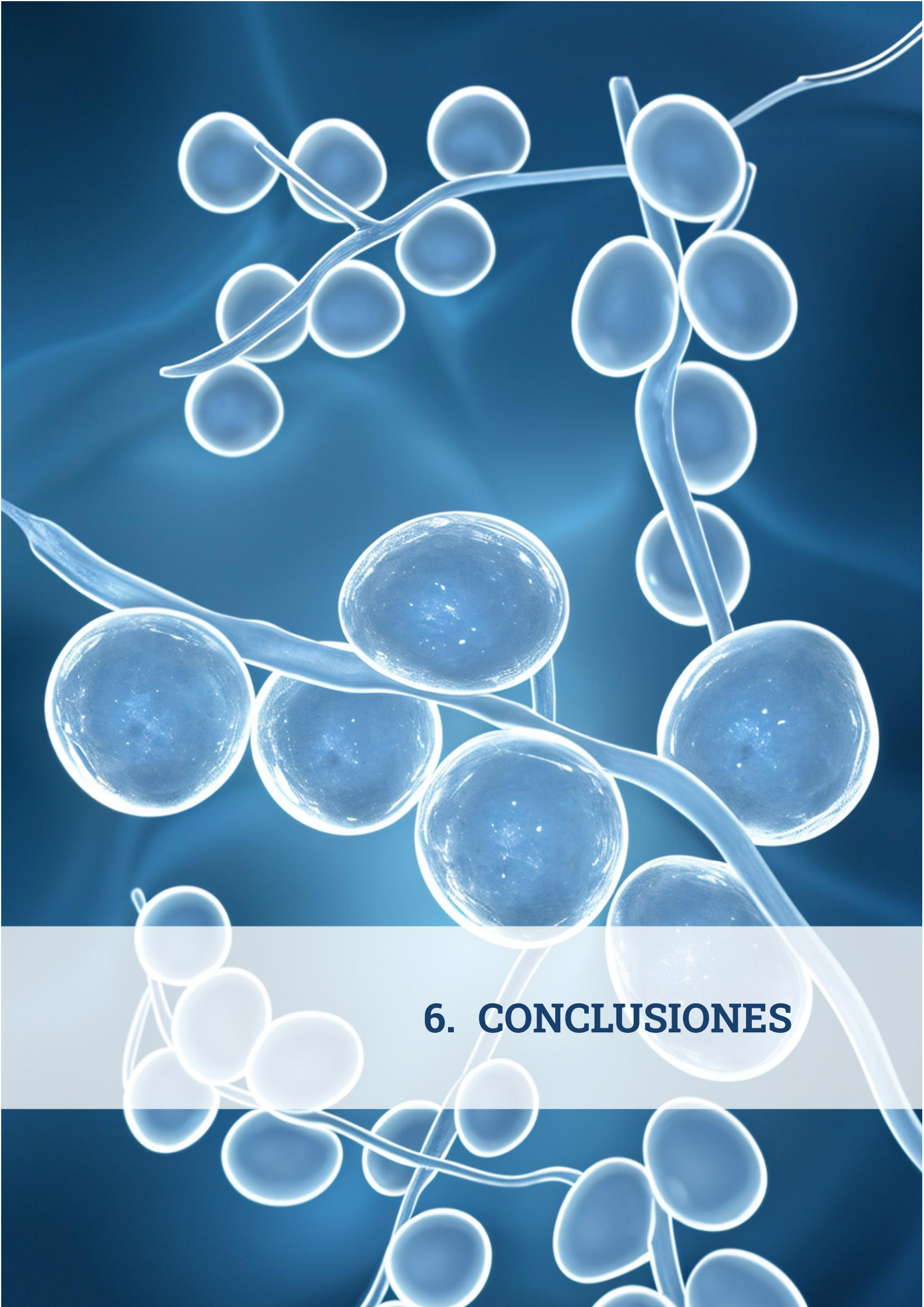
Tras el estudio de permeación *ex vivo*, se llevó a cabo un análisis histológico para verificar si se produjo algún cambio estructural en la piel. Tanto el gel con promotores como sin ellos no causaron alteraciones en el estrato córneo ni en el epitelio, lo que sugiere que ambas formulaciones son bien toleradas a nivel estructural (Figura 12 del artículo 4). Este análisis es esencial para garantizar que las formulaciones no afecten la integridad de la barrera cutánea y, por lo tanto, no comprometan su función protectora, lo que es crucial para el desarrollo de tratamientos tópicos seguros y eficaces, especialmente en el caso de infecciones fúngicas como la candidiasis cutánea.

Como se mencionó previamente en el contexto de los estudios de permeación, la integridad de la piel es un aspecto crucial para evaluar su función barrera, y uno de los parámetros más utilizados para ello es la medición del TEWL. Este parámetro refleja la capacidad de la piel para evitar la pérdida excesiva de agua y mantener su función protectora. Un aumento en el TEWL indica una alteración en la función barrera de la piel, que puede ser causada por lesiones, enfermedades, factores como la edad y el género, o exposición a ambientes secos y cálidos. Esta alteración provoca una mayor pérdida de agua transepidérmica, resultando en irritación y sequedad en la piel (Montero-Vilchez et al., 2021). Otro parámetro igualmente importante, es la hidratación del estrato córneo (SCH, por sus siglas en inglés stratum corneum hydration), que proporciona información sobre el contenido de agua en las capas más superficiales de la piel.

En este contexto, los resultados tras la aplicación de las formulaciones muestran una ligera variación en los valores de TEWL y SCH (Figura 13 del artículo 4), sugiriendo que las formulaciones afectan la hidratación de la piel sin comprometer su integridad. Ambos geles mostraron un aumento inicial en los valores de TEWL, seguido de una estabilización, con una mayor retención de agua en el caso del gel con los promotores. Dado que la hidratación de la piel está directamente relacionada con la capacitancia cutánea, estos resultados indican que las formulaciones aumentan ligeramente la hidratación de la piel en comparación con su comportamiento normal. Además, no se observó irritación visible en la piel tras la aplicación de los geles, lo que indica que ambas son bien toleradas y no comprometen la función protectora de la piel.

En este estudio, se realizaron ensayos *in vitro* para determinar la susceptibilidad de diferentes cepas de *Candida*, incluyendo *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis* y *C. tropicalis*, frente a las formulaciones evaluadas. Ambos geles demostraron ser efectivos a nivel *in vitro* en tres de las cuatro cepas probadas, produciendo amplias zona de inhibición (Figura 14 y Tabla 6 del artículo 4). Este efecto es especialmente relevante considerando el creciente aumento de resistencia a estos medicamentos, especialmente entre pacientes inmunosuprimidos (Farmakiotis et al., 2014). Sin embargo, en el caso de *C. albicans*, se observaron colonias intrahalo dentro de la zona de inhibición, lo que sugiere la presencia de resistencia. Por otro lado, los geles sin CSP mostraron un leve efecto inhibitorio en la zona donde se aplicaron las formulaciones. Este efecto podría estar relacionado con la

presencia de chitosán, un excipiente conocido por sus propiedades antimicrobianas y antifúngicas, como ya se ha comentado anteriormente (Raafat et al., 2008). En conjunto, estos hallazgos destacan el potencial de las formulaciones desarrolladas como una alternativa eficaz para el tratamiento tópico de la candidiasis, ofreciendo no solo actividad antifúngica significativa, sino también una adecuada biocompatibilidad y tolerancia cutánea.

A microscopic image of yeast cells, likely Saccharomyces cerevisiae, showing individual cells and chains of cells. The cells are spherical and have a distinct cell wall. They are set against a blue background with a subtle, wavy pattern. A horizontal white band is positioned across the middle of the image, serving as a background for the section header.

6. CONCLUSIONES

El **principal objetivo** de esta tesis doctoral se ha centrado en el desarrollo y evaluación de varias formulaciones de CSP para su aplicación como terapia tópica, con la finalidad de tratar infecciones fúngicas que afectan a mucosas y piel. A partir de los resultados obtenidos, se ha podido concluir lo que sigue:

Sobre el estado del arte

Las infecciones fúngicas mucocutáneas, especialmente aquellas causadas por *Candida* spp., suponen un desafío clínico cada vez mayor, debido al aumento de resistencias y las limitaciones de los tratamientos actuales. Las formulaciones convencionales presentan problemas como efectos adversos locales, necesidad de aplicaciones frecuentes y barreras específicas según la zona del cuerpo, como irritación ocular, mal sabor en formulaciones bucales, retención limitada en la zona vaginal y efectos secundarios cutáneos.

La CSP, con su mecanismo de acción dirigido a la inhibición de la síntesis de β -1,3-D-glucano, se presenta como una alternativa prometedora para formulaciones tópicas, pese a que tradicionalmente se ha administrado por vía intravenosa.

Sobre las formulaciones desarrolladas

1. Formulaciones oculares

Las formulaciones incluyeron una solución salina fisiológica simple, una solución con P407 al 0,20% y un hidrogel con P407 al 18%. Todas ellas con CSP al 0,50%. Las formulaciones con P407 son más estables térmicamente, manteniendo su pH y apariencia a diversas temperaturas. Los estudios reológicos y FTIR confirmaron la estabilidad de CSP en estas formulaciones. Los estudios de liberación y permeación indicaron que el hidrogel mejoró la retención y penetración en la córnea. Todas demostraron eficacia antifúngica, aunque *C. auris* presentó resistencia. El ensayo HET-CAM indicó una buena tolerancia ocular sin irritación significativa.

La solución salina con P407 al 0,20% destaca como la formulación más prometedora para la administración ocular de CSP, al equilibrar estabilidad, seguridad, permeabilidad y eficacia antimicrobiana. Su estabilidad térmica y química preserva la integridad del fármaco, mientras que su buena tolerancia ocular asegura una aplicación segura y efectiva. Además, el P407 contribuye tanto a la estabilidad como a la posible potenciación de la actividad antifúngica.

2. Formulaciones bucales

Se desarrollaron dos enjuagues, dos hidrogeles y una pasta grasa con CSP al 2%. El hidrogel de quitosán destacó por su alta mucoadhesión y extensibilidad, permitiendo una liberación prolongada del fármaco. El análisis reológico demostró que cada formulación tiene características adecuadas para su aplicación específica, con propiedades tixotrópicas y gelificación termorreversible en el caso de los hidrogeles. Los estudios histológicos mostraron que algunas formulaciones afectan los tejidos de manera diferente. Todas fueron efectivas contra especies de *Candida*, aunque *C. auris* mostró resistencia.

Las formulaciones desarrolladas demostraron ser eficaces para tratar la candidiasis oral, destacando el hidrogel de quitosán por su estabilidad, mucoadhesión y liberación controlada del fármaco. A pesar de posibles alteraciones leves en tejidos orales, permite un tratamiento seguro y efectivo, especialmente en infecciones graves. Mientras los enjuagues son útiles para lesiones extensas, los hidrogeles y la pasta son más adecuados para aplicaciones localizadas, lo que permite personalizar el tratamiento según la ubicación y severidad de las lesiones.

3. Formulaciones vaginales

Las formulaciones vaginales consistieron en tres hidrogeles con CSP al 2% basados en quitosán, P407 y una combinación de ambos. Todos presentaron pH compatible con el entorno vaginal y buena estabilidad. El hidrogel combinado mostró una estructura porosa optimizada, mejorando la liberación y retención del fármaco. Los estudios reológicos revelaron que el gel combinado ofreció excelente extensibilidad y facilidad de aplicación. Además, mostró mejor liberación y retención de CSP, aunque con menor permeación, lo que asegura un efecto terapéutico prolongado. En cuanto a la mucoadhesión, el hidrogel combinado fue superior en comparación con el gel de P407, mostrando mayor interacción con la mucosa. Por otro lado, el gel de P407, aunque fácil de extruir, presentó menor adherencia. Además, todas las formulaciones con CSP fueron efectivas contra *Candida*. Destaca el hidrogel combinado como formulación más prometedora para el tratamiento por su seguridad al preservar la integridad del epitelio vaginal.

4. Formulaciones cutáneas

Se desarrollaron dos hidrogeles de quitosán y P407 con CSP al 2%, uno de ellos con promotores de permeación (Azone y Transcutol-P). Ambos presentaron una apariencia homogénea y sin partículas visibles, lo que garantiza una textura agradable. El gel con promotores mostró mayor viscosidad y porosidad, lo que mejoró la liberación controlada del fármaco y su retención en la piel, mientras que el gel sin promotores liberó el fármaco más rápidamente. Los estudios de liberación confirmaron que el gel con promotores optimiza la retención cutánea, mientras que el gel sin ellos facilita una absorción más rápida. Ambas

formulaciones demostraron ser seguras, sin alterar la barrera cutánea, y mostraron eficacia antimicrobiana contra cepas de *Candida*. Entre las formulaciones evaluadas, el hidrogel con promotores destacó como la opción más eficaz para la administración tópica de CSP.

Conclusión final

Las infecciones fúngicas oportunistas continúan representando un desafío clínico significativo, agravado por la resistencia de ciertas cepas y las limitaciones de los tratamientos antifúngicos convencionales. A pesar de los resultados prometedores obtenidos en esta investigación, somos conscientes de las limitaciones inherentes al diseño experimental. En particular, los métodos utilizados en la mayoría de los ensayos son estáticos y no reflejan completamente las condiciones dinámicas propias del entorno fisiológico. Por ello, se requiere la realización de más estudios *in vivo* para validar estos hallazgos en un contexto clínico real.

Este trabajo demuestra el potencial de las formulaciones desarrolladas como alternativas efectivas y seguras frente a los tratamientos convencionales, especialmente en el tratamiento de infecciones fúngicas mucocutáneas. La inclusión de excipientes funcionales no solo permite una vehiculización eficiente del fármaco, sino que también aporta beneficios adicionales, optimizando la estabilidad, biodisponibilidad y eficacia terapéutica del mismo.

En conjunto, estos hallazgos destacan la importancia de continuar explorando y perfeccionando estas estrategias terapéuticas, con el objetivo de proporcionar soluciones innovadoras para combatir infecciones fúngicas resistentes en entornos clínicos. Además, con estas vías de administración, se podría facilitar el tratamiento en pacientes sin la necesidad de personal médico especializado, como sucede con los tratamientos actualmente comercializados. Esto permitiría a los pacientes administrar la medicación de manera autónoma, siempre con la debida precaución para evitar el desarrollo de resistencias.

A microscopic image of yeast cells, likely Saccharomyces cerevisiae, showing individual cells and chains of cells. The cells are spherical and have a distinct cell wall. The background is a deep blue with a subtle, wavy pattern. A horizontal white band runs across the middle of the image, serving as a background for the section header.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Abd El-Hack, M. E., El-Saadony, M. T., Shafi, M. E., Zabermawi, N. M., Arif, M., Batiha, G. E., Khafaga, A. F., Abd El-Hakim, Y. M., & Al-Sagheer, A. A. (2020). Antimicrobial and antioxidant properties of chitosan and its derivatives and their applications: A review. *International Journal of Biological Macromolecules*, 164, 2726–2744. <https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2020.08.153>
- Abdo, J. M., Sopko, N. A., & Milner, S. M. (2020). The applied anatomy of human skin: A model for regeneration. *Wound Medicine*, 28, 100179. <https://doi.org/10.1016/J.WNDM.2020.100179>
- Abilova, G. K., Kaldybekov, D. B., Irmukhametova, G. S., Kazybayeva, D. S., Iskakbayeva, Z. A., Kudaibergenov, S. E., & Khutoryanskiy, V. V. (2020). Chitosan/poly(2-ethyl-2-oxazoline) films with ciprofloxacin for application in vaginal drug delivery. *Materials*, 13(7). <https://doi.org/10.3390/ma13071709>
- Abu-Jdayil, B., Ghannam, M., Ahmed, K. A., & Djama, M. (2021). The Effect of Biopolymer Chitosan on the Rheology and Stability of Na-Bentonite Drilling Mud. *Polymers*, 13(19). <https://doi.org/10.3390/POLYM13193361>
- Acosta, N., Sánchez, E., Calderón, L., Cordoba-Diaz, M., Cordoba-Diaz, D., Dom, S., & Heras, A. (2015). Physical stability studies of semi-solid formulations from natural compounds loaded with Chitosan Microspheres. *Marine Drugs*, 13(9). <https://doi.org/10.3390/md13095901>
- Addasi, Y., Nguyen, A. H., Sabri, A., Ahmad, F., Rangray, R., & Velagapudi, M. (2023). Gastrointestinal Mucormycosis: A Clinical Review. *Gastroenterology Research*, 16(5), 249–253. <https://doi.org/10.14740/GR1662>
- Adepu, S., & Ramakrishna, S. (2021). Controlled Drug Delivery Systems: Current Status and Future Directions. *Molecules* 2021, Vol. 26, Page 5905, 26(19), 5905. <https://doi.org/10.3390/MOLECULES26195905>
- Ahmadi, F., Oveisi, Z., Samani, M., & Amoozgar, Z. (2015). Chitosan based hydrogels: characteristics and pharmaceutical applications. *Research in Pharmaceutical Sciences*, 10(1), 1. <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC4578208/>
- Ahmed, E. M. (2013). Hydrogel: Preparation, characterization, and applications: A review. *Journal of Advanced Research*, 6(2), 105. <https://doi.org/10.1016/J.JARE.2013.07.006>
- Ahmed, S., Amin, M. M., & Sayed, S. (2023). Ocular Drug Delivery: a Comprehensive Review. *AAPS PharmSciTech*, 24(2). <https://doi.org/10.1208/S12249-023-02516-9>
- Aka-Any-Grah, A., Bouchemal, K., Koffi, A., Agnely, F., Zhang, M., Djabourov, M., & Ponchel, G. (2010). Formulation of mucoadhesive vaginal hydrogels insensitive to dilution with vaginal fluids. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 76(2). <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2010.07.004>
- Alaghawani, N. A., Alkhatib, H., Elmancy, L., & Daou, A. (2024). Harmonizing Innovations: An In-Depth Comparative Review on the Formulation, Applications, and Future Perspectives of Aerogels and Hydrogels in Pharmaceutical Sciences. *Gels* 2024, Vol. 10, Page 663, 10(10), 663. <https://doi.org/10.3390/GELS10100663>

- Alastruey-izquierdo, A., Cuesta, I., Ros, L., Mellado, E., & Rodríguez-tudela, J. L. (2011). Antifungal susceptibility profile of clinical *Alternaria* spp. identified by molecular methods. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 66(11), 2585–2587. <https://doi.org/10.1093/JAC/DKR365>
- Alvarado, H. L., Abrego, G., Garduño-Ramírez, M. L., Clares, B., Calpena, A. C., & García, M. L. (2015). Design and optimization of oleanolic/ursolic acid-loaded nanoplatforms for ocular anti-inflammatory applications. *Nanomedicine : Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 11(3), 521–530. <https://doi.org/10.1016/J.NANO.2015.01.004>
- Amores, S., Domenech, J., Colom, H., Calpena, A. C., Clares, B., Gimeno, Á., & Lauroba, J. (2014). An improved cryopreservation method for porcine buccal mucosa in ex vivo drug permeation studies using Franz diffusion cells. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 60. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2014.04.017>
- Andersen, F. A. (2001). Final report on the safety assessment of Benzyl Alcohol, Benzoic Acid, and Sodium Benzoate. *International Journal of Toxicology*, 20 Suppl 3(SUPPL. 3), 23–50. <https://doi.org/10.1080/10915810152630729>
- Bansal, M., Mittal, N., Yadav, S. K., Khan, G., Gupta, P., Mishra, B., & Nath, G. (2018). Periodontal thermoresponsive, mucoadhesive dual antimicrobial loaded in-situ gel for the treatment of periodontal disease: Preparation, in-vitro characterization and antimicrobial study. *Journal of Oral Biology and Craniofacial Research*, 8(2). <https://doi.org/10.1016/j.jobcr.2017.12.005>
- Baumgartner, A., & Planinšek, O. (2021). Application of commercially available mesoporous silica for drug dissolution enhancement in oral drug delivery. *European Journal of Pharmaceutical Sciences: Official Journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences*, 167. <https://doi.org/10.1016/J.EJPS.2021.106015>
- Berenguer, D., Alcover, M. M., Sessa, M., Halbaut, L., Guillén, C., Boix-montañés, A., Fisa, R., Calpena-campmany, A. C., Riera, C., & Sosa, L. (2020). Topical Amphotericin B Semisolid Dosage Form for Cutaneous Leishmaniasis: Physicochemical Characterization, Ex Vivo Skin Permeation and Biological Activity. *Pharmaceutics*, 12(2). <https://doi.org/10.3390/PHARMACEUTICS12020149>
- Bhandari, J., Thada, P. K., & Nagalli, S. (2023). Rhinocerebral Mucormycosis. In *StatPearls*. StatPearls Publishing. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK559288/>
- Bhattacharya, S., Sae-Tia, S., & Fries, B. C. (2020). Candidiasis and Mechanisms of Antifungal Resistance. *Antibiotics (Basel, Switzerland)*, 9(6), 1–19. <https://doi.org/10.3390/ANTIBIOTICS9060312>
- Bikandi, J., Moragues, M. D., Quindós, G., Polonelli, L., & Pontón, J. (2000). Influence of environmental pH on the reactivity of *Candida albicans* with salivary IgA. *Journal of Dental Research*, 79(6), 1439–1442. <https://doi.org/10.1177/00220345000790061401>
- Bodratti, A. M., & Alexandridis, P. (2018). Formulation of Poloxamers for Drug Delivery. *Journal of Functional Biomaterials*, 9(1). <https://doi.org/10.3390/JFB9010011>
- Branco, J., Miranda, I. M., & Rodrigues, A. G. (2023). *Candida parapsilosis* Virulence and Antifungal Resistance Mechanisms: A Comprehensive Review of Key Determinants. *Journal of Fungi (Basel, Switzerland)*, 9(1). <https://doi.org/10.3390/JOF9010080>

- Brugués, A. P., Naveros, B. C., Calpena Campmany, A. C., Pastor, P. H., Saladrigas, R. F., & Lizandra, C. R. (2015). Developing cutaneous applications of paromomycin entrapped in stimuli-sensitive block copolymer nanogel dispersions. *Nanomedicine (London, England)*, 10(2), 227–240. <https://doi.org/10.2217/NNM.14.102>
- Cadena, J., Thompson, G. R., & Patterson, T. F. (2021). Aspergillosis: Epidemiology, Diagnosis, and Treatment. *Infectious Disease Clinics of North America*, 35(2), 415–434. <https://doi.org/10.1016/J.IDC.2021.03.008>
- Caetano, C. F., Gaspar, C., Martinez-de-Oliveira, J., Palmeira-de-Oliveira, A., & Rolo, J. (2023). The Role of Yeasts in Human Health: A Review. *Life* 2023, Vol. 13, Page 924, 13(4), 924. <https://doi.org/10.3390/LIFE13040924>
- Caramella, C. M., Rossi, S., Ferrari, F., Bonferoni, M. C., & Sandri, G. (2015). Mucoadhesive and thermogelling systems for vaginal drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 92, 39–52. <https://doi.org/10.1016/J.ADDR.2015.02.001>
- Carvalho, G. C., Araujo, V. H. S., Fonseca-Santos, B., de Araújo, J. T. C., de Souza, M. P. C., Duarte, J. L., & Chorilli, M. (2021). Highlights in poloxamer-based drug delivery systems as strategy at local application for vaginal infections. *International Journal of Pharmaceutics*, 602. <https://doi.org/10.1016/J.IJPHARM.2021.120635>
- Castrejón-Jiménez, N. S., Castillo-Cruz, J., Baltierra-Urbe, S. L., Hernández-González, J. C., & García-Pérez, B. E. (2022). Candida glabrata is a successful pathogen: An artist manipulating the immune response. *Microbiological Research*, 260. <https://doi.org/10.1016/J.MICRES.2022.127038>
- Cervera, C. (2012). Candidemia y candidiasis invasora en el adulto. Formas clínicas y tratamiento. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 30(8), 483–491. <https://doi.org/10.1016/J.EIMC.2012.02.003>
- Chatterjee, S., & Hui, P. C. leung. (2019). Review of Stimuli-Responsive Polymers in Drug Delivery and Textile Application. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 24(14). <https://doi.org/10.3390/MOLECULES24142547>
- Chejara, D. R., Kondaveeti, S., Prasad, K., & Siddhanta, A. K. (2013). Studies on the structure–property relationship of sodium alginate based thixotropic hydrogels. *RSC Advances*, 3(36), 15744–15751. <https://doi.org/10.1039/C3RA43070G>
- Chen, S. C. A., Perfect, J., Colombo, A. L., Cornely, O. A., Groll, A. H., Seidel, D., Albus, K., de Almeida, J. N., Garcia-Effron, G., Gilroy, N., Lass-Flörl, C., Ostrosky-Zeichner, L., Pagano, L., Papp, T., Rautemaa-Richardson, R., Salmanton-García, J., Spec, A., Steinmann, J., Arikan-Akdagli, S., ... Govender, N. P. (2021). Global guideline for the diagnosis and management of rare yeast infections: an initiative of the ECMM in cooperation with ISHAM and ASM. *The Lancet. Infectious Diseases*, 21(12), e375–e386. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(21\)00203-6](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(21)00203-6)
- Chen, S. C. A., & Sorrell, T. C. (2007). Antifungal agents. *The Medical Journal of Australia*, 187(7), 404–409. <https://doi.org/10.5694/J.1326-5377.2007.TB01313.X>
- Chen, Y., Lee, J. H., Meng, M., Cui, N., Dai, C. Y., Jia, Q., Lee, E. S., & Jiang, H. B. (2021). An Overview on Thermosensitive Oral Gel Based on Poloxamer 407. *Materials (Basel, Switzerland)*, 14(16). <https://doi.org/10.3390/MA14164522>

- Chevalier, K., Barde, F., Benhamida, S., Le Meur, M., Thyrault, M., Bentoumi, Y., Lau, N., & Lebut, J. (2021). Invasive aspergillosis and endocarditis. *La Revue de Medecine Interne*, 42(10), 678–685. <https://doi.org/10.1016/J.REVMED.2021.07.001>
- Chowdhary, A., Jain, K., & Chauhan, N. (2023). Candida auris Genetics and Emergence. *Annual Review of Microbiology*, 77, 583–602. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV-MICRO-032521-015858>
- Clancy, C. J., & Nguyen, M. H. (2018). Diagnosing Invasive Candidiasis. *Journal of Clinical Microbiology*, 56(5). <https://doi.org/10.1128/JCM.01909-17>
- Cobo, F., Zaragoza, Ó., & Navarro-Marí, J. M. (2020). Rhodotorula dairenensis fungemia in a patient with cancer. *Revista Iberoamericana de Micología*, 37(2), 63–64. <https://doi.org/10.1016/J.RIAM.2020.03.006>
- Cole, G. T. (1996). Basic Biology of Fungi. In *Medical Microbiology*. University of Texas Medical Branch at Galveston.
- Contaldo, M., Di Stasio, D., Romano, A., Fiori, F., Della Vella, F., Rupe, C., Lajolo, C., Petruzzi, M., Serpico, R., & Lucchese, A. (2023). Oral Candidiasis and Novel Therapeutic Strategies: Antifungals, Phytotherapy, Probiotics, and Photodynamic Therapy. *Current Drug Delivery*, 20(5), 441–456. <https://doi.org/10.2174/1567201819666220418104042>
- Cook, M. T., & Brown, M. B. (2018). Polymeric gels for intravaginal drug delivery. *Journal of Controlled Release: Official Journal of the Controlled Release Society*, 270, 145–157. <https://doi.org/10.1016/J.JCONREL.2017.12.004>
- Cortés, P., Jane Hata, D., Libertin, C., Meza Villegas, D. M., & Harris, D. M. (2021). Cladophialophora bantiana and Nocardia farcinica infection simultaneously occurring in a kidney transplant recipient: Case report and literature review. *Immunity, Inflammation and Disease*, 9(4), 1146–1152. <https://doi.org/10.1002/IID3.480>
- Cortez, K. J., Roilides, E., Quiroz-Telles, F., Meletiadiis, J., Antachopoulos, C., Knudsen, T., Buchanan, W., Milanovich, J., Sutton, D. A., Fothergill, A., Rinaldi, M. G., Shea, Y. R., Zaoutis, T., Kottlil, S., & Walsh, T. J. (2008). Infections caused by Scedosporium spp. *Clinical Microbiology Reviews*, 21(1), 157–197. <https://doi.org/10.1128/CMR.00039-07>
- Dadar, M., Tiwari, R., Karthik, K., Chakraborty, S., Shahali, Y., & Dhama, K. (2018). Candida albicans - Biology, molecular characterization, pathogenicity, and advances in diagnosis and control - An update. *Microbial Pathogenesis*, 117, 128–138. <https://doi.org/10.1016/J.MICPATH.2018.02.028>
- Dahiya, S., Chhillar, A. K., Sharma, N., Choudhary, P., Punia, A., Balhara, M., Kaushik, K., & Parmar, V. S. (2020). Candida auris and Nosocomial Infection. *Current Drug Targets*, 21(4), 365–373. <https://doi.org/10.2174/1389450120666190924155631>
- das Neves, J., Notario-Pérez, F., & Sarmiento, B. (2021). Women-specific routes of administration for drugs: A critical overview. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 176. <https://doi.org/10.1016/J.ADDR.2021.113865>

- de Castro, K. C., Coco, J. C., dos Santos, É. M., Ataíde, J. A., Martinez, R. M., do Nascimento, M. H. M., Prata, J., da Fonte, P. R. M. L., Severino, P., Mazzola, P. G., Baby, A. R., Souto, E. B., de Araujo, D. R., & Lopes, A. M. (2023). Pluronic® triblock copolymer-based nanoformulations for cancer therapy: A 10-year overview. *Journal of Controlled Release: Official Journal of the Controlled Release Society*, 353, 802–822. <https://doi.org/10.1016/J.JCONREL.2022.12.017>
- Denning, D. W., Cadranel, J., Beigelman-Aubry, C., Ader, F., Chakrabarti, A., Blot, S., Ullmann, A. J., Dimopoulos, G., & Lange, C. (2016). Chronic pulmonary aspergillosis: rationale and clinical guidelines for diagnosis and management. *The European Respiratory Journal*, 47(1), 45–68. <https://doi.org/10.1183/13993003.00583-2015>
- Desai, P. R., Jain, N. J., Sharma, R. K., & Bahadur, P. (2001). Effect of additives on the micellization of PEO/PPO/PEO block copolymer F127 in aqueous solution. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 178(1–3). [https://doi.org/10.1016/S0927-7757\(00\)00493-3](https://doi.org/10.1016/S0927-7757(00)00493-3)
- Desnos-Ollivier, M., & Lanternier, F. (2024). New antifungals development: rezafungin in candidiasis treatment. *The Lancet Infectious Diseases*, 24(3), 229–231. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(23\)00627-8](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(23)00627-8)
- Dey, S., Rothe, H., Page, L., O'Connor, R., Farahmand, S., Toner, F., Marsh, R., Wehmeyer, K., & Zhou, S. (2015). An in vitro skin penetration model for compromised skin: estimating penetration of polyethylene glycol [¹⁴C]-PEG-7 phosphate. *Skin Pharmacology and Physiology*, 28(1), 12–21. <https://doi.org/10.1159/000362284>
- Dodane, V., Amin Khan, M., & Merwin, J. R. (1999). Effect of chitosan on epithelial permeability and structure. *International Journal of Pharmaceutics*, 182(1). [https://doi.org/10.1016/S0378-5173\(99\)00030-7](https://doi.org/10.1016/S0378-5173(99)00030-7)
- Donovan, C., Arenas, E., Ayyala, R. S., Margo, C. E., & Espana, E. M. (2022). Fungal keratitis: Mechanisms of infection and management strategies. *Survey of Ophthalmology*, 67(3), 758–769. <https://doi.org/10.1016/J.SURVOPHTHAL.2021.08.002>
- dos Santos, M. M., & Ishida, K. (2023). We need to talk about *Candida tropicalis*: Virulence factors and survival mechanisms. *Medical Mycology*, 61(8). <https://doi.org/10.1093/MMY/MYAD075>
- Doughty, M. J., & Jonuscheit, S. (2019). Corneal structure, transparency, thickness and optical density (densitometry), especially as relevant to contact lens wear-a review. *Contact Lens & Anterior Eye: The Journal of the British Contact Lens Association*, 42(3), 238–245. <https://doi.org/10.1016/J.CLAE.2018.11.014>
- Dumortier, G., Grossiord, J. L., Agnely, F., & Chaumeil, J. C. (2006). A review of poloxamer 407 pharmaceutical and pharmacological characteristics. *Pharmaceutical Research*, 23(12), 2709–2728. <https://doi.org/10.1007/S11095-006-9104-4>
- El Moussaoui, S., Abo-horan, I., Halbaut, L., Alonso, C., Coderch, L., Garduño-ramírez, M. L., Clares, B., Soriano, J. L., Calpena, A. C., Fernández-campos, F., & Mallandrich, M. (2021). Polymeric Nanoparticles and Chitosan Gel Loading Ketorolac Tromethamine to Alleviate Pain Associated with Condyloma Acuminata during the Pre- and Post-Ablation. *Pharmaceutics*, 13(11). <https://doi.org/10.3390/PHARMACEUTICS13111784>

- Eliodório, K. P., Cunha, G. C. de G. e., Müller, C., Lucaroni, A. C., Giudici, R., Walker, G. M., Alves, S. L., & Basso, T. O. (2019). Advances in yeast alcoholic fermentations for the production of bioethanol, beer and wine. *Advances in Applied Microbiology*, 109, 61–119. <https://doi.org/10.1016/BS.AAMBS.2019.10.002>
- Espinoza, L. C., Guaya, D., Calpena, A. C., Perotti, R. M., Halbaut, L., Sosa, L., Brito-Llera, A., & Mallandrich, M. (2022). Comparative Study of Donepezil-Loaded Formulations for the Treatment of Alzheimer's Disease by Nasal Administration. *Gels (Basel, Switzerland)*, 8(11). <https://doi.org/10.3390/GELS8110715>
- Falavigna, M., Pattacini, M., Wibel, R., Sonvico, F., Škalko-Basnet, N., & Flaten, G. E. (2020). The vaginal-PVPA: A vaginal mucosa-mimicking in vitro permeation tool for evaluation of mucoadhesive formulations. *Pharmaceutics*, 12(6). <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12060568>
- Famuyide, A., Massoud, T. F., & Moonis, G. (2022). Oral Cavity and Salivary Glands Anatomy. *Neuroimaging Clinics of North America*, 32(4), 777–790. <https://doi.org/10.1016/J.NIC.2022.07.021>
- Farmakiotis, D., Tarrand, J. J., & Kontoyiannis, D. P. (2014). Drug-resistant *Candida glabrata* infection in cancer patients. *Emerging Infectious Diseases*, 20(11), 1833–1840. <https://doi.org/10.3201/EID2011.140685>
- Fisher, M. C., Alastruey-Izquierdo, A., Berman, J., Bicanic, T., Bignell, E. M., Bowyer, P., Bromley, M., Brüggemann, R., Garber, G., Cornely, O. A., Gurr, S. J., Harrison, T. S., Kuijper, E., Rhodes, J., Sheppard, D. C., Warris, A., White, P. L., Xu, J., Zwaan, B., & Verweij, P. E. (2022). Tackling the emerging threat of antifungal resistance to human health. *Nature Reviews. Microbiology*, 20(9), 557–571. <https://doi.org/10.1038/S41579-022-00720-1>
- Frenkel, E. S., & Ribbeck, K. (2015). Salivary mucins in host defense and disease prevention. *Journal of Oral Microbiology*, 7(1), 29759. <https://doi.org/10.3402/JOM.V7.29759>
- Galey, W. R., Lonsdale, H. K., & Nacht, S. (1976). The in vitro permeability of skin and buccal mucosa to selected drugs and tritiated water. *The Journal of Investigative Dermatology*, 67(6), 713–717. <https://doi.org/10.1111/1523-1747.EP12598596>
- Galindo-Camacho, R. M., Haro, I., Gómara, M. J., Espina, M., Fonseca, J., Martins-Gomes, C., Camins, A., Silva, A. M., García, M. L., & Souto, E. B. (2023). Cell penetrating peptides-functionalized Licochalcone-A-loaded PLGA nanoparticles for ocular inflammatory diseases: Evaluation of in vitro anti-proliferative effects, stabilization by freeze-drying and characterization of an in-situ forming gel. *International Journal of Pharmaceutics*, 639. <https://doi.org/10.1016/J.IJPHARM.2023.122982>
- Galocha-León, C., Antich, C., Voltes-Martínez, A., Marchal, J. A., Mallandrich, M., Halbaut, L., Rodríguez-Lagunas, M. J., Souto, E. B., Clares-Naveros, B., & Gálvez-Martín, P. (2023). Development and characterization of a poloxamer hydrogel composed of human mesenchymal stromal cells (hMSCs) for reepithelization of skin injuries. *International Journal of Pharmaceutics*, 647. <https://doi.org/10.1016/J.IJPHARM.2023.123535>
- García, C. S., Palop, N. T., Bayona, J. V. M., García, M. M., Rodríguez, D. N., Álvarez, M. B., Serrano, M. del R. G., & Cardona, C. G. (2020). *Candida auris*: report of an outbreak. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (English Ed.)*, 38 Suppl 1, 39–44. <https://doi.org/10.1016/J.EIMC.2020.02.007>

- Garrós, N., Mallandrich, M., Beirampour, N., Mohammadi, R., Domènech, Ò., Rodríguez-Lagunas, M. J., Clares, B., & Colom, H. (2022). Baricitinib Liposomes as a New Approach for the Treatment of Sjögren's Syndrome. *Pharmaceutics*, 14(9). <https://doi.org/10.3390/PHARMACEUTICS14091895>
- Gaudana, R., Ananthula, H. K., Parenky, A., & Mitra, A. K. (2010). Ocular drug delivery. *The AAPS Journal*, 12(3), 348–360. <https://doi.org/10.1208/S12248-010-9183-3>
- Genesi, B. P., de Melo Barbosa, R., Severino, P., Rodas, A. C. D., Yoshida, C. M. P., Mathor, M. B., Lopes, P. S., Viseras, C., Souto, E. B., & Ferreira da Silva, C. (2023). Aloe vera and copaiba oleoresin-loaded chitosan films for wound dressings: microbial permeation, cytotoxicity, and in vivo proof of concept. *International Journal of Pharmaceutics*, 634. <https://doi.org/10.1016/J.IJPHARM.2023.122648>
- Gilaberte, Y., Prieto-Torres, L., Pastushenko, I., & Juarranz, Á. (2016). Anatomy and Function of the Skin. *Nanoscience in Dermatology*, 1–14. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802926-8.00001-X>
- Giuliano, E., Paolino, D., Fresta, M., & Cosco, D. (2018). Mucosal Applications of Poloxamer 407-Based Hydrogels: An Overview. *Pharmaceutics*, 10(3). <https://doi.org/10.3390/PHARMACEUTICS10030159>
- Goldstein, M. H., Silva, F. Q., Blender, N., Tran, T., & Vantipalli, S. (2022). Ocular benzalkonium chloride exposure: problems and solutions. *Eye (London, England)*, 36(2), 361–368. <https://doi.org/10.1038/S41433-021-01668-X>
- Gonzalez-Lara, M. F., & Ostrosky-Zeichner, L. (2020). Invasive Candidiasis. *Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine*, 41(1), 3–12. <https://doi.org/10.1055/S-0040-1701215>
- Gosecka, M., & Gosecki, M. (2021). Antimicrobial Polymer-Based Hydrogels for the Intravaginal Therapies-Engineering Considerations. *Pharmaceutics*, 13(9). <https://doi.org/10.3390/PHARMACEUTICS13091393>
- Gratieri, T., Gelfuso, G. M., De Freitas, O., Rocha, E. M., & Lopez, R. F. V. (2011). Enhancing and sustaining the topical ocular delivery of fluconazole using chitosan solution and poloxamer/chitosan in situ forming gel. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics: Official Journal of Arbeitsgemeinschaft Fur Pharmazeutische Verfahrenstechnik e. V*, 79(2), 320–327. <https://doi.org/10.1016/J.EJPB.2011.05.006>
- Graziottin, A., & Gambini, D. (2015). Anatomy and physiology of genital organs - women. *Handbook of Clinical Neurology*, 130, 39–60. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63247-0.00004-3>
- Guo, Y. gong, & Pratap Singh, A. (2019). Emerging strategies for enhancing buccal and sublingual administration of nutraceuticals and pharamaceuticals. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 52, 440–451. <https://doi.org/10.1016/J.JDDST.2019.05.014>
- Gushiken, A. C., Saharia, K. K., & Baddley, J. W. (2021). Cryptococcosis. *Infectious Disease Clinics of North America*, 35(2), 493–514. <https://doi.org/10.1016/J.IDC.2021.03.012>

- Hameed, H., Faheem, S., Paiva-Santos, A. C., Sarwar, H. S., & Jamshaid, M. (2024). A Comprehensive Review of Hydrogel-Based Drug Delivery Systems: Classification, Properties, Recent Trends, and Applications. *AAPS PharmSciTech*, 25(4). <https://doi.org/10.1208/S12249-024-02786-X>
- Harmouchi, H., Sani, R., Issoufou, I., Lakranbi, M., Ouadnoui, Y., & Smahi, M. (2020). Pulmonary aspergilloma: from classification to management. *Asian Cardiovascular & Thoracic Annals*, 28(1), 33–38. <https://doi.org/10.1177/0218492319895113>
- Hirano, R., Mitsuhashi, T., & Osanai, K. (2022). Rhodotorula mucilaginosa Fungemia, a Rare Opportunistic Infection without Central Venous Catheter Implantation, Successfully Treated by Liposomal Amphotericin B. *Case Reports in Infectious Diseases*, 2022, 1–4. <https://doi.org/10.1155/2022/7830126>
- Ho, T. C., Chang, C. C., Chan, H. P., Chung, T. W., Shu, C. W., Chuang, K. P., Duh, T. H., Yang, M. H., & Tyan, Y. C. (2022). Hydrogels: Properties and Applications in Biomedicine. *Molecules*, 27(9), 2902. <https://doi.org/10.3390/MOLECULES27092902>
- Hou, K., Wu, Z. X., Chen, X. Y., Wang, J. Q., Zhang, D., Xiao, C., Zhu, D., Koya, J. B., Wei, L., Li, J., & Chen, Z. S. (2022). Microbiota in health and diseases. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 7(1), 135. <https://doi.org/10.1038/S41392-022-00974-4>
- Hua, S. (2020). Advances in Oral Drug Delivery for Regional Targeting in the Gastrointestinal Tract - Influence of Physiological, Pathophysiological and Pharmaceutical Factors. *Frontiers in Pharmacology*, 11. <https://doi.org/10.3389/FPHAR.2020.00524>
- Hurtado-Sarrió, M., Duch-Samper, A., Cisneros-Lanuza, A., Díaz-Llopis, M., Peman-García, J., & Vazquez-Polo, A. (2010). Successful topical application of caspofungin in the treatment of fungal keratitis refractory to voriconazole. *Archives of Ophthalmology (Chicago, Ill. : 1960)*, 128(7), 941–942. <https://doi.org/10.1001/ARCHOPHTHALMOL.2010.110>
- Ibáñez-Cortés, M., Martín-Piedra, M. Á., Blanco-Elices, C., García-García, Ó. D., España-López, A., Fernández-Valadés, R., Sánchez-Quevedo, M. del C., Alaminos, M., Chato-Astrain, J., & Garzón, I. (2023). Histological characterization of the human masticatory oral mucosa. A histochemical and immunohistochemical study. *Microscopy Research and Technique*, 86(12), 1712–1724. <https://doi.org/10.1002/JEMT.24398>
- Ibrahim, A. A. E., Bagherani, N., Smoller, B., Bagherani, N., & Reyes-Barron, C. (2021). Anatomy and Organization of Human Skin. *Atlas of Dermatology, Dermatopathology and Venereology: Cutaneous Anatomy, Biology and Inherited Disorders and General Dermatologic Concepts*, 109–132. https://doi.org/10.1007/978-3-319-53811-2_3
- Jafarzadeh, L., Ranjbar, M., Nazari, T., Naeimi Eshkaleti, M., Aghaei Gharehbolagh, S., Sobel, J. D., & Mahmoudi, S. (2022). Vulvovaginal candidiasis: An overview of mycological, clinical, and immunological aspects. *The Journal of Obstetrics and Gynaecology Research*, 48(7), 1546–1560. <https://doi.org/10.1111/JOG.15267>
- Jamiu, A. T., Albertyn, J., Sebolai, O. M., & Pohl, C. H. (2021). Update on Candida krusei, a potential multidrug-resistant pathogen. *Medical Mycology*, 59(1), 14–30. <https://doi.org/10.1093/MMY/MYAA031>

- Jayatilake, J. A. M. S. (2011). A review of the ultrastructural features of superficial candidiasis. *Mycopathologia*, 171(4), 235–250. <https://doi.org/10.1007/S11046-010-9373-7>
- Jenks, J. D., Cornely, O. A., Chen, S. C. A., Thompson, G. R., & Hoenigl, M. (2020). Breakthrough invasive fungal infections: Who is at risk? *Mycoses*, 63(10), 1021–1032. <https://doi.org/10.1111/myc.13148>
- Jírová, D., Kejlová, K., Janoušek, S., Bendová, H., Malý, M., Kolářová, H., & Dvořáková, M. (2014). Eye irritation hazard of chemicals and formulations assessed by methods in vitro. *Undefined*.
- Johnston, T. P., & Johnston, T. P. (2015). *Anatomy and Physiology of the Oral Mucosa*. 1–15. https://doi.org/10.1007/978-1-4899-7558-4_1
- Jørgensen, M. R. (2024). Pathophysiological microenvironments in oral candidiasis. *APMIS: Acta Pathologica, Microbiologica, et Immunologica Scandinavica*. <https://doi.org/10.1111/APM.13412>
- Kakizaki, M. I. T., & Melhem, M. D. S. C. (2023). CRYPTOCOCCOSIS: A bibliographic narrative review on antifungal resistance. *Anais Da Academia Brasileira de Ciencias*, 95(suppl 1). <https://doi.org/10.1590/0001-3765202320220862>
- Kels, B. D., Grzybowski, A., & Grant-Kels, J. M. (2015). Human ocular anatomy. *Clinics in Dermatology*, 33(2), 140–146. <https://doi.org/10.1016/J.CLINDERMATOL.2014.10.006>
- Kneale, M., Bartholomew, J. S., Davies, E., & Denning, D. W. (2016). Global access to antifungal therapy and its variable cost. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 71(12), 3599–3606. <https://doi.org/10.1093/JAC/DKW325>
- Knop, M. (2011). Yeast cell morphology and sexual reproduction--a short overview and some considerations. *Comptes Rendus Biologies*, 334(8–9), 599–606. <https://doi.org/10.1016/J.CRVI.2011.05.007>
- Köhler, J. R., Hube, B., Puccia, R., Casadevall, A., & Perfect, J. R. (2017). Fungi that Infect Humans. *Microbiology Spectrum*, 5(3). <https://doi.org/10.1128/MICROBIOLSPEC.FUNK-0014-2016>
- Kulchar, R. J., Singh, R., Ding, S., Alexander, E., Leong, K. W., & Daniell, H. (2023). Delivery of biologics: Topical administration. *Biomaterials*, 302. <https://doi.org/10.1016/J.BIOMATERIALS.2023.122312>
- Kulkarni, V. S., & Shaw, C. (2016). Use of Polymers and Thickeners in Semisolid and Liquid Formulations. *Essential Chemistry for Formulators of Semisolid and Liquid Dosages*, 43–69. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801024-2.00005-4>
- Kumar, R., Islam, T., & Nurunnabi, M. (2022). Mucoadhesive carriers for oral drug delivery. *Journal of Controlled Release: Official Journal of the Controlled Release Society*, 351, 504–559. <https://doi.org/10.1016/J.JCONREL.2022.09.024>
- Lass-Flörl, C., Kanj, S. S., Govender, N. P., Thompson, G. R., Ostrosky-Zeichner, L., & Govrins, M. A. (2024). Invasive candidiasis. *Nature Reviews. Disease Primers*, 10(1). <https://doi.org/10.1038/S41572-024-00503-3>

- Litwiniuk, M., Krejner, A., & Grzela, T. (2016). Hyaluronic Acid in Inflammation and Tissue Regeneration. *Wounds: A Compendium of Clinical Research and Practice*, 28(3), 78–88. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26978861/>
- Liu, B., & Chen, K. (2024). Advances in Hydrogel-Based Drug Delivery Systems. *Gels*, 10(4), 262. <https://doi.org/10.3390/GELS10040262>
- Liu, Y., Yang, F., Feng, L., Yang, L., Chen, L., Wei, G., & Lu, W. (2017). In vivo retention of poloxamer-based in situ hydrogels for vaginal application in mouse and rat models. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 7(4). <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2017.03.003>
- Lobanovska, M., & Pilla, G. (2017). Focus: Drug Development: Penicillin's Discovery and Antibiotic Resistance: Lessons for the Future? *The Yale Journal of Biology and Medicine*, 90(1), 135. [/pmc/articles/PMC5369031/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5369031/)
- Lockhart, S. R., Chowdhary, A., & Gold, J. A. W. (2023). The rapid emergence of antifungal resistant human-pathogenic fungi. *Nature Reviews. Microbiology*, 21(12), 818. <https://doi.org/10.1038/S41579-023-00960-9>
- Lopes, J. P., & Lionakis, M. S. (2022). Pathogenesis and virulence of *Candida albicans*. *Virulence*, 13(1), 89–121. <https://doi.org/10.1080/21505594.2021.2019950>
- Lu, H., Hong, T., Jiang, Y., Whiteway, M., & Zhang, S. (2023). Candidiasis: From cutaneous to systemic, new perspectives of potential targets and therapeutic strategies. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 199. <https://doi.org/10.1016/J.ADDR.2023.114960>
- Lyu, X., Zhao, C., Yan, Z. M., & Hua, H. (2016). Efficacy of nystatin for the treatment of oral candidiasis: a systematic review and meta-analysis. *Drug Design, Development and Therapy*, 10, 1161–1171. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S100795>
- Machado, M., Fortún, J., & Muñoz, P. (2024). Invasive aspergillosis: A comprehensive review. *Medicina Clínica*. <https://doi.org/10.1016/J.MEDCLI.2024.01.045>
- Madani, M., Berardi, T., & Stoopler, E. T. (2014). Anatomic and examination considerations of the oral cavity. *The Medical Clinics of North America*, 98(6), 1225–1238. <https://doi.org/10.1016/J.MCNA.2014.08.001>
- Mallandrich, M., Fernández-Campos, F., Clares, B., Halbaut, L., Alonso, C., Coderch, L., Garduño-Ramírez, M. L., Andrade, B., del Pozo, A., Lane, M. E., & Calpena, A. C. (2017). Developing Transdermal Applications of Ketorolac Tromethamine Entrapped in Stimuli Sensitive Block Copolymer Hydrogels. *Pharmaceutical Research*, 34(8), 1728–1740. <https://doi.org/10.1007/S11095-017-2181-8>
- Martin, L., Wilson, C. G., Koosha, F., & Uchegbu, I. F. (2003). Sustained buccal delivery of the hydrophobic drug denbufylline using physically cross-linked palmitoyl glycol chitosan hydrogels. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics: Official Journal of Arbeitsgemeinschaft Fur Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V.*, 55(1), 35–45. [https://doi.org/10.1016/S0939-6411\(02\)00118-2](https://doi.org/10.1016/S0939-6411(02)00118-2)
- Maziarz, E. K., & Perfect, J. R. (2016). Cryptococcosis. *Infectious Disease Clinics of North America*, 30(1), 179–206. <https://doi.org/10.1016/J.IDC.2015.10.006>

- Mba, I. E., & Nweze, E. I. (2020). Mechanism of Candida pathogenesis: revisiting the vital drivers. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases: Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology*, 39(10), 1797–1819. <https://doi.org/10.1007/S10096-020-03912-W>
- McCarthy, M. W., Katragkou, A., Iosifidis, E., Roilides, E., & Walsh, T. J. (2018). Recent Advances in the Treatment of Scedosporiosis and Fusariosis. *Journal of Fungi (Basel, Switzerland)*, 4(2). <https://doi.org/10.3390/JOF4020073>
- McCarty, T. P., White, C. M., & Pappas, P. G. (2021). Candidemia and Invasive Candidiasis. *Infectious Disease Clinics of North America*, 35(2), 389–413. <https://doi.org/10.1016/J.IDC.2021.03.007>
- McCort, M. E., & Tsai, H. (2023). Epidemiology of Invasive Candidiasis in Patients with Hematologic Malignancy on Antifungal Prophylaxis. *Mycopathologia*, 188(6), 885–892. <https://doi.org/10.1007/S11046-023-00754-W>
- Meek, K. M. (2008). The Cornea and Sclera. *Collagen: Structure and Mechanics*, 359–396. https://doi.org/10.1007/978-0-387-73906-9_13
- Mehta, V., Nayyar, C., Gulati, N., Singla, N., Rai, S., & Chandar, J. (2021). A Comprehensive Review of Trichosporon spp.: An Invasive and Emerging Fungus. *Cureus*, 13(8). <https://doi.org/10.7759/CUREUS.17345>
- Mejías Manzano, M. de los Á., Giráldez Gallego, Á., Ontanilla Clavijo, G., & Sousa Martín, J. M. (2019). Terbinafine-induced hepatotoxicity. *Gastroenterología y Hepatología*, 42(6), 394–395. <https://doi.org/10.1016/J.GASTROHEP.2018.05.022>
- Mellado, F., Rojas, T., & Cumsille, C. (2013). [Fungal keratitis: review of diagnosis and treatment]. *Arquivos Brasileiros de Oftalmologia*, 76(1), 52–56. <https://doi.org/10.1590/S0004-27492013000100016>
- Meng, X. C., Jiang, T., Yi, S. H., Xie, P. Y., Guo, Y. F., Quan, L., Zhou, J., Zhu, K. S., & Shan, H. (2014). Renal aspergillosis after liver transplantation: clinical and imaging manifestations in two cases. *World Journal of Gastroenterology*, 20(48), 18495–18502. <https://doi.org/10.3748/WJG.V20.I48.18495>
- Mfoafo, K., Kwon, Y., Omid, Y., & Omidian, H. (2022). Contemporary applications of thermogelling PEO-PPO-PEO triblock copolymers. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 70, 103182. <https://doi.org/10.1016/J.JDDST.2022.103182>
- Millsop, J. W., & Fazel, N. (2016). Oral candidiasis. *Clinics in Dermatology*, 34(4), 487–494. <https://doi.org/10.1016/J.CLINDERMATOL.2016.02.022>
- Miralles, E., Kamma-Lorger, C. S., Domènech, Ò., Sosa, L., Casals, I., Calpena, A. C., & Silva-Abreu, M. (2022). Assessment of Efficacy and Safety Using PPAR-γ Agonist-Loaded Nanocarriers for Inflammatory Eye Diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(19). <https://doi.org/10.3390/IJMS23191184>
- Mizgier, M., Jarzabek-Bielecka, G., Mruczyk, K., & Kedzia, W. (2020). The role of diet and probiotics in prevention and treatment of bacterial vaginosis and vulvovaginal candidiasis in adolescent girls and non-pregnant women. *Ginekologia Polska*, 91(7), 412–416. <https://doi.org/10.5603/GP.2020.0070>

- Mohammadi-Meyabadi, R., Beirampour, N., Garrós, N., Alvarado, H. L., Limón, D., Silva-Abreu, M., Calpena, A. C., & Mallandrich, M. (2022). Assessing the Solubility of Baricitinib and Drug Uptake in Different Tissues Using Absorption and Fluorescence Spectroscopies. *Pharmaceutics*, *14*(12). <https://doi.org/10.3390/PHARMACEUTICS14122714>
- Montero-Vilchez, T., Segura-Fernández-nogueras, M. V., Pérez-Rodríguez, I., Soler-Gongora, M., Martinez-Lopez, A., Fernández-González, A., Molina-Leyva, A., & Arias-Santiago, S. (2021). Skin Barrier Function in Psoriasis and Atopic Dermatitis: Transepidermal Water Loss and Temperature as Useful Tools to Assess Disease Severity. *Journal of Clinical Medicine*, *10*(2), 1–12. <https://doi.org/10.3390/JCM10020359>
- Neoh, C. F., Leung, L., Misra, A., Vajpayee, R. B., Davies, G. E., Fullinfaw, R. O., Stewart, K., & Kong, D. C. M. (2011). Penetration of topically administered 0.5-percent caspofungin eye drops into human aqueous humor. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *55*(4), 1761–1763. <https://doi.org/10.1128/AAC.01175-10>
- Nguyen, S., & Hiorth, M. (2015). Advanced drug delivery systems for local treatment of the oral cavity. *Therapeutic Delivery*, *6*(5), 197–210. <https://doi.org/10.4155/TDE.15.5>
- Niu, L., Liu, X., Ma, Z., Yin, Y., Sun, L., Yang, L., & Zheng, Y. (2020). Fungal keratitis: Pathogenesis, diagnosis and prevention. *Microbial Pathogenesis*, *138*. <https://doi.org/10.1016/J.MICPATH.2019.103802>
- Nocua-Báez, L. C., Uribe-Jerez, P., Tarazona-Guaranga, L., Robles, R., & Cortés, J. A. (2020). [Azoles of then and now: a review]. *Revista Chilena de Infectología : Organo Oficial de La Sociedad Chilena de Infectología*, *37*(3), 219–230. <https://doi.org/10.4067/S0716-10182020000300219>
- Noguchi, H., Matsumoto, T., Kimura, U., Hiruma, M., Kusuhara, M., & Ihn, H. (2019). Cutaneous Cryptococcosis. *Medical Mycology Journal*, *60*(4), 101–107. <https://doi.org/10.3314/MMJ.19.008>
- Nucci, F., Nouér, S. A., Capone, D., Anaissie, E., & Nucci, M. (2015). Fusariosis. *Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine*, *36*(5), 706–714. <https://doi.org/10.1055/S-0035-1562897>
- Nucci, M., & Anaissie, E. (2023). Invasive fusariosis. *Clinical Microbiology Reviews*, *36*(4). <https://doi.org/10.1128/CMR.00159-22>
- Nyirjesy, P., Brookhart, C., Lazenby, G., Schwebke, J., & Sobel, J. D. (2022). Vulvovaginal Candidiasis: A Review of the Evidence for the 2021 Centers for Disease Control and Prevention of Sexually Transmitted Infections Treatment Guidelines. *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, *74*(Suppl_2), S162–S168. <https://doi.org/10.1093/CID/CIAB1057>
- Oiartzabal-Arano, E., Perez-de-Nanclares-Arregi, E., Espeso, E. A., & Etxebeste, O. (2016). Apical control of conidiation in *Aspergillus nidulans*. *Current Genetics*, *62*(2), 371–377. <https://doi.org/10.1007/S00294-015-0556-0>
- Osborne, D. W., & Musakhanian, J. (2018). Skin Penetration and Permeation Properties of Transcutol®–Neat or Diluted Mixtures. *AAPS PharmSciTech*, *19*(8), 3512. <https://doi.org/10.1208/S12249-018-1196-8>

- Osmalek, T., Froelich, A., Jadach, B., Tatarek, A., Gadzinski, P., Falana, A., Gralinska, K., Ekert, M., Puri, V., Wrotyńska-Barczyńska, J., & Michniak-Kohn, B. (2021). Recent Advances in Polymer-Based Vaginal Drug Delivery Systems. *Pharmaceutics*, 13(6). <https://doi.org/10.3390/PHARMACEUTICS13060884>
- Palmeira-de-Oliveira, R., Palmeira-de-Oliveira, A., & Martinez-de-Oliveira, J. (2015). New strategies for local treatment of vaginal infections. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 92, 105–122. <https://doi.org/10.1016/J.ADDR.2015.06.008>
- Patel, V. F., Liu, F., & Brown, M. B. (2011). Advances in oral transmucosal drug delivery. *Journal of Controlled Release : Official Journal of the Controlled Release Society*, 153(2), 106–116. <https://doi.org/10.1016/J.JCONREL.2011.01.027>
- Patil, A., & Majumdar, S. (2017). Echinocandins in antifungal pharmacotherapy. *The Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 69(12), 1635–1660. <https://doi.org/10.1111/JPHP.12780>
- Permana, A. D., Utami, R. N., Layadi, P., Himawan, A., Juniarti, N., Anjani, Q. K., Utomo, E., Mardikasari, S. A., Arjuna, A., & Donnelly, R. F. (2021). Thermosensitive and mucoadhesive in situ ocular gel for effective local delivery and antifungal activity of itraconazole nanocrystal in the treatment of fungal keratitis. *International Journal of Pharmaceutics*, 602. <https://doi.org/10.1016/J.IJPHARM.2021.120623>
- Petelin, M., Pavlica, Z., Bizimoska, S., & Šentjerc, M. (2004). In vivo study of different ointments for drug delivery into oral mucosa by EPR oximetry. *International Journal of Pharmaceutics*, 270(1–2), 83–91. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2003.10.030>
- Phongkhun, K., Pothikamjorn, T., Srisurapanont, K., Manothummetha, K., Sanguankeo, A., Thongkam, A., Chuleerarux, N., Leksuwanakun, S., Meejun, T., Thanakitcharu, J., Walker, M., Gopinath, S., Torvorapanit, P., Langsiri, N., Worasilchai, N., Moonla, C., Plongla, R., Kates, O. S., Nematollahi, S., & Permpalung, N. (2023). Prevalence of Ocular Candidiasis and Candida Endophthalmitis in Patients With Candidemia: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Clinical Infectious Diseases : An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, 76(10), 1738–1749. <https://doi.org/10.1093/CID/CIAD064>
- Powers-Fletcher, M. V., Kendall, B. A., Griffin, A. T., & Hanson, K. E. (2016). Filamentous Fungi. *Microbiology Spectrum*, 4(3). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.dmih2-0002-2015>
- Puppo, V. (2013). Anatomy and physiology of the clitoris, vestibular bulbs, and labia minora with a review of the female orgasm and the prevention of female sexual dysfunction. *Clinical Anatomy (New York, N.Y.)*, 26(1), 134–152. <https://doi.org/10.1002/CA.22177>
- Quiles-Melero, I., & García-Rodríguez, J. (2021). [Systemic antifungal drugs]. *Revista Iberoamericana de Micología*, 38(2), 42–46. <https://doi.org/10.1016/J.RIAM.2021.04.004>
- Raafat, D., & Sahl, H. G. (2009). Chitosan and its antimicrobial potential--a critical literature survey. *Microbial Biotechnology*, 2(2), 186–201. <https://doi.org/10.1111/J.1751-7915.2008.00080.X>
- Raafat, D., Von Bargen, K., Haas, A., & Sahl, H. G. (2008). Insights into the mode of action of chitosan as an antibacterial compound. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(12). <https://doi.org/10.1128/AEM.00453-08>

- Raina, N., Pahwa, R., Bhattacharya, J., Paul, A. K., Nissapatorn, V., Pereira, M. de L., Oliveira, S. M. R., Dolma, K. G., Rahmatullah, M., Wilairatana, P., & Gupta, M. (2022). Drug Delivery Strategies and Biomedical Significance of Hydrogels: Translational Considerations. *Pharmaceutics*, 14(3). <https://doi.org/10.3390/PHARMACEUTICS14030574>
- Ramos-Pardo, A., Castro-Álvarez, R., Quindós, G., Eraso, E., Sevillano, E., & Kaberdin, V. R. (2023). Assessing pH-dependent activities of virulence factors secreted by *Candida albicans*. *MicrobiologyOpen*, 12(1), e1342. <https://doi.org/10.1002/MB03.1342>
- Reid, G., Lynch, J. P., Fishbein, M. C., & Clark, N. M. (2020). Mucormycosis. *Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine*, 41(1), 99–114. <https://doi.org/10.1055/S-0039-3401992>
- Roberson, R. W. (2020). Subcellular structure and behaviour in fungal hyphae. *Journal of Microscopy*, 280(2), 75–85. <https://doi.org/10.1111/JMI.12945>
- Roberts, M. S., Cheruvu, H. S., Mangion, S. E., Alinaghi, A., Benson, H. A. E., Mohammed, Y., Holmes, A., van der Hoek, J., Pastore, M., & Grice, J. E. (2021). Topical drug delivery: History, percutaneous absorption, and product development. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 177. <https://doi.org/10.1016/J.ADDR.2021.113929>
- Rosa, A., Pujia, A. M., & Arcuri, C. (2024). Hyaluronic Acid Combined with Ozone in Dental Practice. *Biomedicines* 2024, Vol. 12, Page 2522, 12(11), 2522. <https://doi.org/10.3390/BIOMEDICINES12112522>
- Rosati, D., Bruno, M., Jaeger, M., Ten Oever, J., & Netea, M. G. (2020). Recurrent Vulvovaginal Candidiasis: An Immunological Perspective. *Microorganisms*, 8(2). <https://doi.org/10.3390/MICROORGANISMS8020144>
- Rougeron, A., Giraud, S., Alastruey-Izquierdo, A., Cano-Lira, J., Rainer, J., Mouhajir, A., Le Gal, S., Nevez, G., Meyer, W., & Bouchara, J. P. (2018). Ecology of *Scedosporium* Species: Present Knowledge and Future Research. *Mycopathologia*, 183(1), 185–200. <https://doi.org/10.1007/S11046-017-0200-2>
- Ruiz-Camps, I., & Cuenca-Estrella, M. (2009). [Antifungals for systemic use]. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 27(6), 353–362. <https://doi.org/10.1016/J.EIMC.2009.04.001>
- Sacco, P., Furlani, F., De Marzo, G., Marsich, E., Paoletti, S., & Donati, I. (2018). Concepts for Developing Physical Gels of Chitosan and of Chitosan Derivatives. *Gels (Basel, Switzerland)*, 4(3), 67. <https://doi.org/10.3390/GELS4030067>
- Saikia, C., & Gogoi, P. (2015). Chitosan: A Promising Biopolymer in Drug Delivery Applications. *Journal of Molecular and Genetic Medicine*, s4. <https://doi.org/10.4172/1747-0862.s4-006>
- Sakai, D., Matsumiya, W., Kusuhaara, S., & Nakamura, M. (2021). Factors associated with the development of ocular candidiasis and ocular prognosis with echinocandin therapy for candidemia. *Journal of Ophthalmic Inflammation and Infection*, 11(1). <https://doi.org/10.1186/S12348-021-00248-0>
- Sakamoto, T., Gotoh, K., Hashimoto, K., Tanamachi, C., & Watanabe, H. (2022). Risk Factors and Clinical Characteristics of Patients with Ocular Candidiasis. *Journal of Fungi (Basel, Switzerland)*, 8(5). <https://doi.org/10.3390/JOF8050497>

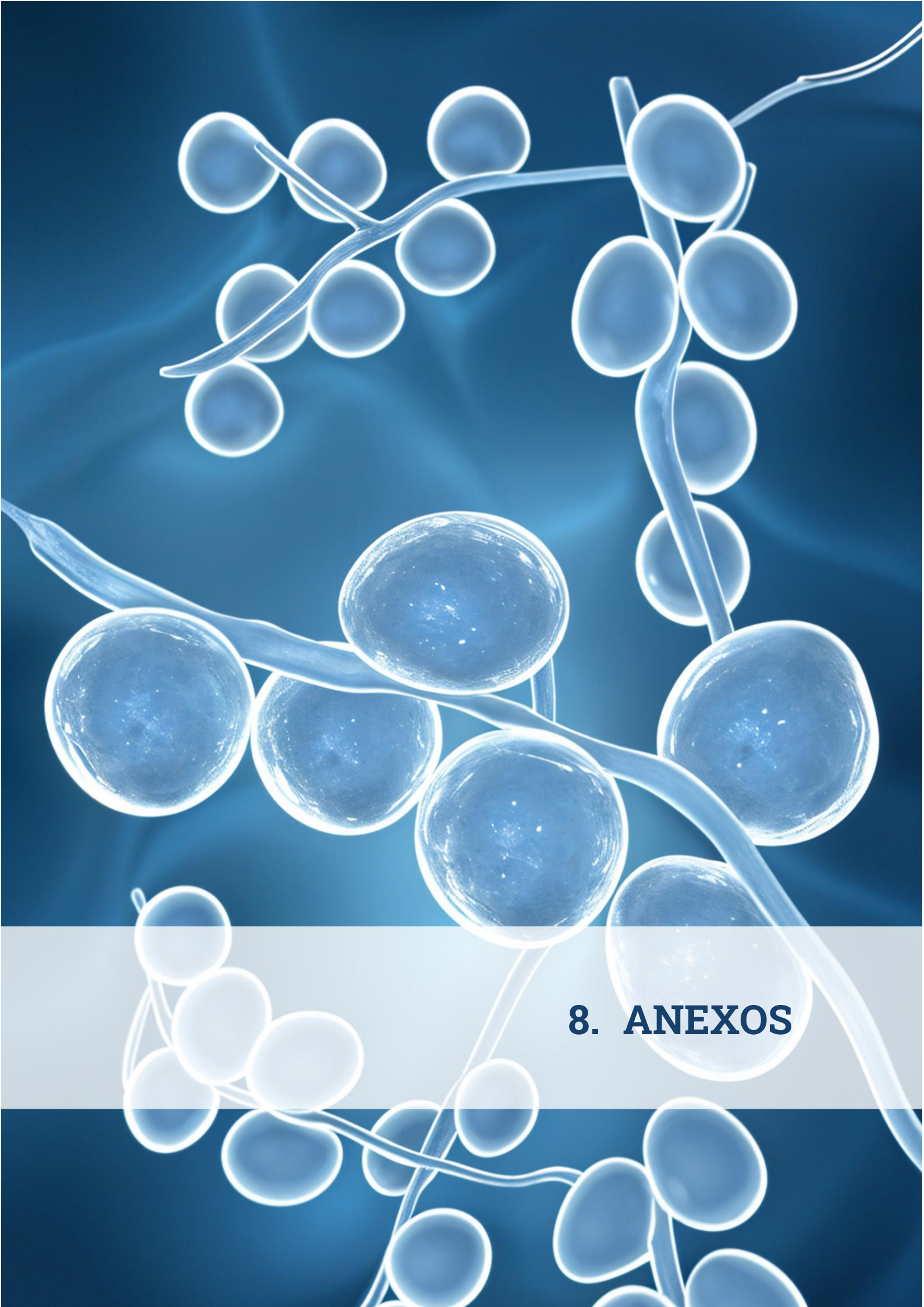
- Sanz, R., Calpena, A. C., Mallandrich, M., Gimeno, Á., Halbaut, L., & Clares, B. (2017). Development of a buccal doxepin platform for pain in oral mucositis derived from head and neck cancer treatment. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics: Official Journal of Arbeitsgemeinschaft Fur Pharmazeutische Verfahrenstechnik e. V*, *117*, 203–211. <https://doi.org/10.1016/J.EJPB.2017.04.019>
- Sanz, R., Clares, B., Mallandrich, M., Suñer-Carbó, J., Montes, M. J., & Calpena, A. C. (2018). Development of a mucoadhesive delivery system for control release of doxepin with application in vaginal pain relief associated with gynecological surgery. *International Journal of Pharmaceutics*, *535*(1–2), 393–401. <https://doi.org/10.1016/J.IJPHARM.2017.11.027>
- Saunte, D. M. L., Gaitanis, G., & Hay, R. J. (2020). Malassezia-Associated Skin Diseases, the Use of Diagnostics and Treatment. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, *10*, 112. <https://doi.org/10.3389/FCIMB.2020.00112>
- Sha, X. Y., Shi, Q., Liu, L., & Zhong, J. X. (2021). Update on the management of fungal keratitis. *International Ophthalmology*, *41*(9), 3249–3256. <https://doi.org/10.1007/S10792-021-01873-3>
- Shaarani, S., Hamid, S. S., & Kaus, N. H. M. (2017). The Influence of Pluronic F68 and F127 Nanocarrier on Physicochemical Properties, In vitro Release, and Antiproliferative Activity of Thymoquinone Drug. *Pharmacognosy Research*, *9*(1), 12. <https://doi.org/10.4103/0974-8490.199774>
- Shahabudin, S., Azmi, N. S., Lani, M. N., Mukhtar, M., & Hossain, M. S. (2024). Candida albicans skin infection in diabetic patients: An updated review of pathogenesis and management. *Mycoses*, *67*(6). <https://doi.org/10.1111/MYC.13753>
- Sharma, N., Bagga, B., Singhal, D., Nagpal, R., Kate, A., Saluja, G., & Maharana, P. K. (2022). Fungal keratitis: A review of clinical presentations, treatment strategies and outcomes. *The Ocular Surface*, *24*, 22–30. <https://doi.org/10.1016/J.JTOS.2021.12.001>
- Silva, S., Negri, M., Henriques, M., Oliveira, R., Williams, D. W., & Azeredo, J. (2012). Candida glabrata, Candida parapsilosis and Candida tropicalis: biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance. *FEMS Microbiology Reviews*, *36*(2), 288–305. <https://doi.org/10.1111/J.1574-6976.2011.00278.X>
- Silva-Abreu, M., Calpena, A. C., Espina, M., Silva, A. M., Gimeno, A., Egea, M. A., & García, M. L. (2018). Optimization, Biopharmaceutical Profile and Therapeutic Efficacy of Pioglitazone-loaded PLGA-PEG Nanospheres as a Novel Strategy for Ocular Inflammatory Disorders. *Pharmaceutical Research*, *35*(1). <https://doi.org/10.1007/S11095-017-2319-8>
- Silva-Abreu, M., Miralles, E., Kamma-Lorger, C. S., Espina, M., García, M. L., & Calpena, A. C. (2021). Stabilization by nano spray dryer of pioglitazone polymeric nanosystems: Development, in vivo, ex vivo and synchrotron analysis. *Pharmaceutics*, *13*(11), 1751. <https://doi.org/10.3390/PHARMACEUTICS13111751/S1>
- Singh, D. K., Tóth, R., & Gácsér, A. (2020). Mechanisms of Pathogenic Candida Species to Evade the Host Complement Attack. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, *10*. <https://doi.org/10.3389/FCIMB.2020.00094>

- Singh, S., Capoor, M. R., Varshney, S., Gupta, D. K., Verma, P. K., & Ramesh, V. (2019). Epidemiology and Antifungal Susceptibility of Infections Caused by Trichosporon Species: An Emerging Non-Candida and Non-Cryptococcus Yeast Worldwide. *Indian Journal of Medical Microbiology*, 37(4), 536–541. https://doi.org/10.4103/IJMM.IJMM_19_146
- Singla, P., Singh, O., Sharma, S., Betlem, K., Aswal, V. K., Peeters, M., & Mahajan, R. K. (2019). Temperature-Dependent Solubilization of the Hydrophobic Antiepileptic Drug Lamotrigine in Different Pluronic Micelles-A Spectroscopic, Heat Transfer Method, Small-Angle Neutron Scattering, Dynamic Light Scattering, and in Vitro Release Study. *ACS Omega*, 4(6), 11251–11262. <https://doi.org/10.1021/ACSOMEGA.9B00939>
- Soliman, K. A., Ullah, K., Shah, A., Jones, D. S., & Singh, T. R. R. (2019). Poloxamer-based in situ gelling thermoresponsive systems for ocular drug delivery applications. *Drug Discovery Today*, 24(8), 1575–1586. <https://doi.org/10.1016/J.DRUDIS.2019.05.036>
- Son, Y. E., Yu, J. H., & Park, H. S. (2023). Regulators of the Asexual Life Cycle of *Aspergillus nidulans*. *Cells*, 12(11). <https://doi.org/10.3390/CELLS12111544>
- Soriano, J. L., Calpena, A. C., Rincon, M., Perez, N., Halbaut, L., Rodriguez-Lagunas, M. J., & Clares, B. (2020). Melatonin nanogel promotes skin healing response in burn wounds of rats. *Nanomedicine*, 15(22). <https://doi.org/10.2217/nnm-2020-0193>
- Soriano-Ruiz, J. L., Calpena-Campmany, A. C., Silva-Abreu, M., Halbout-Bellowa, L., Bozal-de Febrer, N., Rodríguez-Lagunas, M. J., & Clares-Naveros, B. (2020). Design and evaluation of a multifunctional thermosensitive poloxamer-chitosan-hyaluronic acid gel for the treatment of skin burns. *International Journal of Biological Macromolecules*, 142, 412–422. <https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2019.09.113>
- Sridhar, M. S. (2018). Anatomy of cornea and ocular surface. *Indian Journal of Ophthalmology*, 66(2), 190. https://doi.org/10.4103/IJO.IJO_646_17
- Srikrishna, S., & Cardozo, L. (2013). The vagina as a route for drug delivery: a review. *International Urogynecology Journal*, 24(4), 537–543. <https://doi.org/10.1007/S00192-012-2009-3>
- Steinbrink, J. M., & Miceli, M. H. (2021). Mucormycosis. *Infectious Disease Clinics of North America*, 35(2), 435–452. <https://doi.org/10.1016/J.IDC.2021.03.009>
- Subi, M. T. M., Selvasudha, N., & Vasanthi, H. R. (2024). Vaginal drug delivery system: A promising route of drug administration for local and systemic diseases. *Drug Discovery Today*, 29(6), 104012. <https://doi.org/10.1016/J.DRUDIS.2024.104012>
- Sun, Z., Ge, X., Qiu, B., Xiang, Z., Jiang, C., Wu, J., & Li, Y. (2023). Vulvovaginal candidiasis and vaginal microflora interaction: Microflora changes and probiotic therapy. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 13. <https://doi.org/10.3389/FCIMB.2023.1123026>
- Szymański, M., Chmielewska, S., Czyżewska, U., Malinowska, M., & Tylicki, A. (2022). Echinocandins – structure, mechanism of action and use in antifungal therapy. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 37(1), 876. <https://doi.org/10.1080/14756366.2022.2050224>

- Takeuchi, H., Thongborisute, J., Matsui, Y., Sugihara, H., Yamamoto, H., & Kawashima, Y. (2005). Novel mucoadhesion tests for polymers and polymer-coated particles to design optimal mucoadhesive drug delivery systems. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 57(11), 1583–1594. <https://doi.org/10.1016/J.ADDR.2005.07.008>
- Tas, C., Ozkan, Y., Okyar, A., & Savaser, A. (2007). In vitro and ex vivo permeation studies of etodolac from hydrophilic gels and effect of terpenes as enhancers. *Drug Delivery*, 14(7), 453–459. <https://doi.org/10.1080/10717540701603746>
- Taudorf, E. H., Jemec, G. B. E., Hay, R. J., & Saunte, D. M. L. (2019). Cutaneous candidiasis - an evidence-based review of topical and systemic treatments to inform clinical practice. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology : JEADV*, 33(10), 1863–1873. <https://doi.org/10.1111/JDV.15782>
- Thang, N. H., Chien, T. B., & Cuong, D. X. (2023). Polymer-Based Hydrogels Applied in Drug Delivery: An Overview. *Gels* 2023, Vol. 9, Page 523, 9(7), 523. <https://doi.org/10.3390/GELS9070523>
- Theelen, B., Cafarchia, C., Gaitanis, G., Bassukas, I. D., Boekhout, T., & Dawson, T. L. (2018). Malassezia ecology, pathophysiology, and treatment. *Medical Mycology*, 56(suppl_1), S10–S25. <https://doi.org/10.1093/MMY/MYX134>
- Tsantes, A. G., Papadopoulos, D. V., Markou, E., Zarokostas, K., Sokou, R., Trikoupi, I., Mavrogenis, A. F., Houhoula, D., Piovani, D., Bonovas, S., Tsantes, A. E., Tsakris, A., & Vrioni, G. (2022). Aspergillus spp. osteoarticular infections: an updated systematic review on the diagnosis, treatment and outcomes of 186 confirmed cases. *Medical Mycology*, 60(8). <https://doi.org/10.1093/MMY/MYAC052>
- Ullah, F., Othman, M. B. H., Javed, F., Ahmad, Z., & Akil, H. M. (2015). Classification, processing and application of hydrogels: A review. *Materials Science & Engineering. C, Materials for Biological Applications*, 57, 414–433. <https://doi.org/10.1016/J.MSEC.2015.07.053>
- Van Burik, J. A. H., Colven, R., & Spach, D. H. (1998). Cutaneous aspergillosis. *Journal of Clinical Microbiology*, 36(11), 3115–3121. <https://doi.org/10.1128/JCM.36.11.3115-3121.1998>
- Vasquez-Martínez, N., Guillen, D., Moreno-Mendieta, S. A., Sanchez, S., & Rodríguez-Sanoja, R. (2023). The Role of Mucoadhesion and Mucopenetration in the Immune Response Induced by Polymer-Based Mucosal Adjuvants. *Polymers*, 15(7). <https://doi.org/10.3390/POLYM15071615>
- Vestita, M., Tedeschi, P., & Bonamonte, D. (2022). Anatomy and Physiology of the Skin. *Textbook of Plastic and Reconstructive Surgery: Basic Principles and New Perspectives*, 3–13. https://doi.org/10.1007/978-3-030-82335-1_1/FIGURES/3
- Vila, T., Sultan, A. S., Montelongo-Jauregui, D., & Jabra-Rizk, M. A. (2020). Oral Candidiasis: A Disease of Opportunity. *Journal of Fungi (Basel, Switzerland)*, 6(1). <https://doi.org/10.3390/JOF6010015>
- Vitiello, A., Ferrara, F., Boccellino, M., Ponzo, A., Cimmino, C., Comberiati, E., Zovi, A., Clemente, S., & Sabbatucci, M. (2023). Antifungal Drug Resistance: An Emergent Health Threat. *Biomedicines*, 11(4), 1063. <https://doi.org/10.3390/BIOMEDICINES11041063>

- Wang, F., Han, R. H., & Chen, S. (2023). An Overlooked and Underrated Endemic Mycosis—Talaromycosis and the Pathogenic Fungus *Talaromyces marneffe*. *Clinical Microbiology Reviews*, 36(1). <https://doi.org/10.1128/CMR.00051-22>
- Wang, W., Meng, Q., Li, Q., Liu, J., Zhou, M., Jin, Z., & Zhao, K. (2020). Chitosan derivatives and their application in biomedicine. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 21, Issue 2). <https://doi.org/10.3390/ijms21020487>
- Wang, W. Y., Hui, P. C. L., Wat, E., Ng, F. S. F., Kan, C. W., Lau, C. B. S., & Leung, P. C. (2016). Enhanced transdermal permeability via constructing the porous structure of poloxamer-based hydrogel. *Polymers*, 8(11). <https://doi.org/10.3390/polym8110406>
- Watkins, R. R., Gowen, R., Lionakis, M. S., & Ghannoum, M. (2022). Update on the Pathogenesis, Virulence, and Treatment of *Candida auris*. *Pathogens & Immunity*, 7(2), 46–65. <https://doi.org/10.20411/PAI.V7I2.535>
- Wendland, J. (2001). Comparison of morphogenetic networks of filamentous fungi and yeast. *Fungal Genetics and Biology: FG & B*, 34(2), 63–82. <https://doi.org/10.1006/FGBI.2001.1290>
- Wiederhold, N. P. (2021). Emerging Fungal Infections: New Species, New Names, and Antifungal Resistance. *Clinical Chemistry*, 68(1), 83–90. <https://doi.org/10.1093/CLINCHEM/HVAB217>
- Winning, L., Lundy, F. T., Blackwood, B., McAuley, D. F., & El Karim, I. (2021). Oral health care for the critically ill: a narrative review. *Critical Care*, 25(1), 1–8. <https://doi.org/10.1186/S13054-021-03765-5/TABLES/2>
- Yan, D., Li, Y., Liu, Y., Li, N., Zhang, X., & Yan, C. (2021). Antimicrobial Properties of Chitosan and Chitosan Derivatives in the Treatment of Enteric Infections. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 26(23). <https://doi.org/10.3390/MOLECULES26237136>
- Yang, C., Cai, J., Wei, Q., Lian, H., & An, L. (2024). Clinical efficacy of cyclosporin and natamycin for fungal keratitis. *Pakistan Journal of Medical Sciences*, 40(5), 974–978. <https://doi.org/10.12669/PJMS.40.5.7777>
- Yang, Y., & Lockwood, A. (2022). Topical ocular drug delivery systems: Innovations for an unmet need. *Experimental Eye Research*, 218. <https://doi.org/10.1016/J.EXER.2022.109006>
- Yener, G., Dal, Ö., & Üner, M. (2009). Effect of vehicles on release of meloxicam from various topical formulations. *Open Drug Delivery Journal*, 3, 19–23. <https://doi.org/10.2174/1874126600903010019>
- Yuan, N., Shao, K., Huang, S., & Chen, C. (2023). Chitosan, alginate, hyaluronic acid and other novel multifunctional hydrogel dressings for wound healing: A review. *International Journal of Biological Macromolecules*, 240. <https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2023.124321>
- Zarrintaj, P., Ramsey, J. D., Samadi, A., Atoufi, Z., Yazdi, M. K., Ganjali, M. R., Amirabad, L. M., Zangene, E., Farokhi, M., Formela, K., Saeb, M. R., Mozafari, M., & Thomas, S. (2020). Poloxamer: A versatile tri-block copolymer for biomedical applications. *Acta Biomaterialia*, 110, 37–67. <https://doi.org/10.1016/J.ACTBIO.2020.04.028>

- Zein, S. El, Hindy, J. R., & Kanj, S. S. (2020). Invasive Saprochaete Infections: An Emerging Threat to Immunocompromised Patients. *Pathogens (Basel, Switzerland)*, 9(11), 1–14. <https://doi.org/10.3390/PATHOGENS9110922>
- Zhang, Y., Song, W., Geng, J., Chitgupi, U., Unsal, H., Federizon, J., Rzaev, J., Sukumaran, D. K., Alexandridis, P., & Lovell, J. F. (2016). Therapeutic surfactant-stripped frozen micelles. *Nature Communications*, 7. <https://doi.org/10.1038/ncomms11649>
- Zhao, T., Wang, D., Zhao, S., Chen, J., Dou, T., Ge, G., Wang, C., Meng, Q., Sun, H., Liu, K., & Wu, J. (2021). Comparison of the Inhibitory Effects of Clotrimazole and Ketoconazole against Human Carboxylesterase 2. *Current Drug Metabolism*, 22(5), 391–398. <https://doi.org/10.2174/1389200222666210210115509>
- Zhou, Y., Cheng, L., Lei, Y. L., Ren, B., & Zhou, X. (2021). The Interactions Between Candida albicans and Mucosal Immunity. *Frontiers in Microbiology*, 12. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2021.652725>



8. ANEXOS

Anexo 1. Material suplementario del artículo 2

1. Validation of the method

1.1. Linearity and range

Linearity was evaluated by constructing calibration curves at five concentration levels (10-500 µg/mL). A one-way analysis of variance (ANOVA) was used to compare the ratio of peak areas to nominal concentrations of each standard. Differences were considered statistically significant when $P < 0.05$. Linear regression analysis and mathematical calculations were performed using Prism® V. 5.00 software. No statistically significant differences were found after one-way analysis of variance, indicating that the method is linear over the range of concentrations tested. The linearity results can be seen in **Table 1**.

Table 1. Validation parameters of standard curves for CSP quantification in physiological saline 0.9% including the range of linearity, curve equations, correlation coefficient and the linear regression analysis.

	R1	R2	R3	R4	R5
Linear range (µg/mL)	10-500				
Best-fit values					
<i>Slope</i>	12060.0 ± 44.9	12050.0 ± 50.6	11650.0 ± 58.3	11640.0 ± 42.6	11580.0 ± 42.8
<i>Y-intercept when X=0.0</i>	14410 ± 11060	-5034 ± 12440	393.6 ± 14350	-22000 ± 10480	-22620 ± 10530
Goodness of Fit					
<i>r²</i>	1.0000	0.9999	0.9999	1.0000	1.0000
One-way analysis of variance					
<i>P value</i>	0.0572				
<i>P value summary</i>	ns				
<i>Are means signif. different? (P < 0.05)</i>	No				
<i>Number of groups</i>	5				
<i>F</i>	2.7440				
<i>R squared</i>	0.3544				

1.2. Specificity

Specificity of the method was assessed by the absence of interference of the media employed as blank at the retention times showed by the 100 µg/mL standard solution. The specificity of the developed analytical method was evaluated to assess the effect of the medium on CSP detection. The results confirmed that the medium did not interfere with the CSP peaks, which remained detectable at approximately 3.90 min. Therefore, the method is considered highly specific for the detection and quantification of CSP without alterations.

1.3. Sensitivity

The LOD and LOQ values were determined based on the standard deviation of the response and the slope of the calibration curves and are shown in **Table 2**.

Table 2. Limit of Detection (LOD) and Limit of Quantification (LOQ) data.

Linear range (µg/mL)	LOD (µg/mL)	LOQ (µg/mL)
10-500	3.29 ± 0.47	9.98 ± 1.41

1.4. Accuracy

Accuracy was determined through recovery studies at concentration levels of 10, 50, 100, 200, and 500 µg/mL, assessed in five replicates and expressed as relative error (RE, %). The method was considered accurate if RE was within $\pm 15\%$. The result shown in **Table 3** demonstrate that the analytical procedure is accurate

Table 3. Accuracy (% RE) values for CSP standard.

Concentration (µg/mL)	RE (%)
10	-0.52
50	3.33
100	-0.90
200	-0.60
500	0.10

1.5. Precision

Precision was determined by within-day repeatability and intermediate precision. The data obtained were used to calculate the mean and relative standard deviation (RSD, %). The method was considered precise if the RSD was within $\pm 15\%$. The result shown in **Table 4** demonstrate that the analytical procedure is precise, ensuring reliable results.

Table 4. Within-day and between-day precision (% RSD) values for CSP standard.

Concentration (µg/mL)	Within-day (n=5)		Between-day (n=5)	
	Back-calculated conc. $\pm$ SD (µg/mL)	RSD (%)	Back-calculated conc. $\pm$ SD (µg/mL)	RSD (%)
10	8.75 $\pm$ 1.18	13.54	10.05 $\pm$ 1.08	10.71
50	47.94 $\pm$ 1.22	2.55	48.33 $\pm$ 0.73	1.52
100	99.74 $\pm$ 3.69	3.69	100.90 $\pm$ 0.36	0.36
200	205.48 $\pm$ 4.56	2.22	201.21 $\pm$ 1.02	0.51
500	498.09 $\pm$ 1.12	0.23	499.50 $\pm$ 0.44	0.09

1.6. Stability

The stability of CSP was assessed by maintaining a standard of 10 µg/mL and a standard of 500 µg/mL for 6 hours at $37 \pm 0.50^\circ\text{C}$, conditions corresponding to the release and permeation test. The data obtained after carrying out the t-Student test are shown in the **Table 5**. These temperature conditions do not appear to modify the stability of CSP.

Table 5. Statistical analysis test t-Student versus time expressed by P value.

Time (h)	Temperature of applicability (37°C)	
	10 µg/mL	500 µg/mL
0-6	P value	P value
	0.3241	0.1678