

Efecto del ketoconazol incluido en nanopartículas lipídicas sólidas en *Candida albicans*

Effect of ketoconazole loaded solid lipid nanoparticles in Candida albicans

Abraham Faustino-Vega^{1,2}, Carlos T. Quirino-Barreda¹ y Karla D. Vega-Rodríguez²

¹Departamento de Sistemas Biológicos, Farmacia Molecular y Liberación Modificada, de la UAM Xochimilco, México.

²Facultad de Ciencia y Tecnología, Universidad Simón Bolívar, México.
abraham.faustino@gmail.com

Recepción: 29 de noviembre de 2013

Aceptación: 19 de diciembre de 2013

(pp. 95 - 102)

Resumen

El ketoconazol es un fármaco antimicótico muy utilizado. A pesar de su amplio espectro como agente antifúngico, adolece de dos características que hacen difícil su utilización, es poco soluble en agua y además se degrada fácilmente. En este trabajo se informa de un sistema basado en nanopartículas lipídicas sólidas (SLN) para ser empleado como sistema de liberación modificada de ketoconazol y así mejorar su actividad terapéutica. Las nanopartículas lipídicas fueron preparadas por el método de fusión-homogeneización y caracterizadas en tamaño, potencial Z, forma y actividad antifúngica. La formulación optimizada generó nanopartículas esféricas con un tamaño promedio de 82 ± 0.75 nm y un potencial Z de -14 ± 0.05 mV. El tamaño de partícula en suspensión incrementó ligeramente en el transcurso de un mes. Para garantizar la estabilidad del sistema, éstas fueron liofilizadas. También se ensayó la eficacia de la actividad antifúngica del sistema contra *Candida albicans*, los resultados sugieren que se mejora la actividad antifúngica del ketoconazol incluido en nanopartículas lipídicas en comparación con las formas farmacéuticas convencionales (tabletas y suspensión); este hecho permitirá incluir las nanopartículas con ketoconazol en aplicaciones tópicas, y de esta forma mejorar el tratamiento contra las micosis cutáneas.

Palabras clave: Nanopartículas sólidas lipídicas, ketoconazol, antifúngico

Abstract

*Ketoconazole (KTZ) is a widely used antifungal drug. Despite its broad spectrum as antifungal agent, it suffers from two characteristics that make difficult its utilization. It is poorly water soluble and undergoes degradation. The paper reports a system based on solid lipid nanoparticles (SLN) to be employed as modified delivery system of ketoconazole in topical formulations in order to improve the therapeutic activity of drug. Lipid nanoparticles were prepared by hot melt-homogenization method and characterized in size, zeta potential, form and antifungal activity. The optimized formulation render spherical nanoparticles with average size of 82 ± 0.75 nm and a zeta potential of -12 ± 0.05 mV. The nanoparticle size increased slightly in the course of a month. To ensure stability, they were lyophilized. The efficacy of the system has been exploited testing the antifungal activity against *Candida albicans*, the results suggest that the antifungal activity of ketoconazole loaded solid lipid nanoparticles is enhanced compared to those made in conventional dosage forms; this will enable include the nanoparticle system in topical applications and thus improve the treatment of skin mycosis.*

Key words: Solid lipid nanoparticles, ketoconazole, antifungal

Introducción

A pesar de los grandes avances en el desarrollo de antimicrobianos, muchas enfermedades infecciosas, especialmente las infecciones intracelulares, siguen siendo difíciles de tratar. Una de las razones principales se debe a que muchos fármacos antimicrobianos se les dificultan atravesar las membranas celulares y por lo tanto tienen baja actividad dentro de las células. Para subsanar estos problemas, se han propuesto estrategias de liberación de fármacos antimicrobianos alterna (Zhang, Pornpattananangkul, Hu y Huang, 2010).

Al incluir a los fármacos en nano-acarreadores pueden mejorarse significativamente la farmacocinética y el índice terapéutico, en contraste con las formulaciones que contienen sólo el fármaco libre. Entre los sistemas acarreadores que existen en la actualidad, las Nanopartículas Lipídicas Sólidas (SLN, por sus siglas en inglés) representan una manera viable para lograr dicha meta. Las SLN se formulan simplemente intercambiando el lípido líquido de las emulsiones, por un lípido sólido, lo que significa que son sólidas a temperatura ambiente y a temperatura corporal. Son de forma esférica, con un diámetro entre 50 a 500 nm, y al estar dispersas en un medio acuoso, forman un sistema coloidal (con una proporción de agua del 70-95 %) que permite la liberación de fármacos de manera controlada y localizada (Bhaskar et. al., 2009; Huh y Kwon, 2011).

Las ventajas de la utilización de las nanopartículas lipídicas como nano acarreadores incluyen: la utilización de lípidos fisiológicos en su formulación, evitan el uso de disolventes orgánicos en su preparación y la posibilidad de ser utilizadas en un espectro amplio para la administración sobre la **piel**, por vía oral y por vía intravenosa, mediante los medicamentos tradicionales como son las pomadas, tabletas, cápsulas, suspensiones o soluciones inyectables. Las SLN protegen a los fármacos contra agentes externos como la luz y la humedad, presentan una mejor biodisponibilidad y pueden ser diseñadas para dar perfiles de liberación prolongada de sustancias activas poco solubles en agua, al incorporarlas en la matriz lipídica sólida. (Das, Ng y Tan, 2012; Deng y Xia, 2012; Niculae, Lacatusu, Badea y Meghea, 2012; Wang et. al., 2012).

La micosis es una de las principales enfermedades a nivel mundial y se estima que la padecen aproximadamente 40 millones de personas tanto en países desarrollados como no desarrollados. De los compuestos utilizados para tratar la micosis, los derivados azólicos son los preferidos, ya que son efectivos contra todas infecciones micóticas. En particular, el ketoconazol es de los más empleados, este fármaco es una base débil con una moderada liposolubilidad, un peso molecular de 532 g/mol y un bajo coeficiente

de permeabilidad de 1.2×10^{-3} , lo que hace que no se mantengan concentraciones terapéuticas en la epidermis al emplear los sistemas convencionales de liberación de fármacos (cremas y lociones), esto hace que se requieran múltiples aplicaciones para el tratamiento y que en muchas ocasiones el paciente no termine el tratamiento. Lo anterior hace que el ketoconazol sea un buen candidato para ser incorporado en un sistema de liberación de fármaco como lo son las SLN y de esta forma mejorar su desempeño como agente antimicótico (Manual, 2013).

Objetivo

Formular y evaluar nanopartículas sólidas lipídicas cargadas con ketoconazol, empleando la técnica de fusión-homogeneización en caliente, usando como modelo *Candida albicans*.

Método

Preparación de nanopartículas lipídicas sólidas vacías y cargadas con ketoconazol, utilizando homogeneizador de alta velocidad y ultrasonificación. Se prepararon nanopartículas lipídicas sólidas (SLN) variando la fracción volumétrica (ϕ =masa lípido/volumen total) y la concentración de estabilizante (poloxámero PF68 y PF407). Se utilizaron valores de ϕ de 0.25; 0.5 y 1.0, y de poloxámero de 25 y 50 mg/ml en agua deionizada. Todas las formulaciones contaron con la adición de lecitina de huevo (1 a 5 en relación con la matriz lipídica). Las SLN fueron preparadas a una temperatura 10°C por arriba de la temperatura de fusión del lípido, empleando un homogeneizador Ultraturrax T18 (IKA-Labortechnik, GmbH & Co. Staufen, Alemania) equipado con el accesorio dispersante S18N-19G a diferentes velocidades y tiempos, seguido de cuatro ciclos de sonicación de 2 minutos cada uno. Una vez que se obtuvieron las nanopartículas vacías, se procedió a incorporar el principio activo en las nanopartículas, para ello, una vez que el lípido estuvo fundido se le adicionó el fármaco y finalmente proceder como ya se ha explicado con anterioridad.

Tamaño promedio de partícula y potencial Z de las SLN. La distribución del tamaño de partícula se determinó por difracción de luz láser (Horiba, Partica LA 950) que mide en un intervalo de $0.01 \mu\text{m}$

hasta $3000 \mu\text{m}$, y por dispersión de luz láser con un equipo Malvern Zetasizer NanoZS, que mide en el intervalo de 0.1 nm y $6 \mu\text{m}$. El potencial Z fue medido por espectroscopía de correlación fotónica utilizando un Nanosizer ZS ZENN3600 (Malvern Instruments Ltd, Malvern, UK) por movilidad electroforética. Los valores reportados son el promedio de cinco resultados. Las mediciones de movilidad electroforética fueron convertidos a potencial Z usando la ecuación de Smoluchoski.

Microscopía electrónica de transmisión (TEM).

TEM fue usado para caracterizar la microestructura de las SLN. Una gota de la muestra fue aplicada en forma de película en una rejilla de cobre, se adicionó una solución de ácido fosfotúngstico sobre la rejilla. Las muestras fueron examinadas usando un microscopio electrónico de transmisión de alta resolución (HRTEM, Jeol 2100F, Japón).

Liofilización: Las SLN fueron liofilizadas usando una liofilizadora (Labconco, Missouri, USA). Se utilizó un congelamiento lento (-20°C). Las muestras fueron liofilizadas por 48 horas de -20 a 20°C con incremento de 3°C por hora. Las SLN fueron reconstituidas con agitación magnética para incorporarlas en el hidrogel.

Antibiogramas SLN con ketoconazol. Las nanopartículas lipídicas sólidas fueron ensayadas para verificar si presentaban actividad antifúngica contra *Candida albicans* cepa ATC10231. Se empleó el método de difusión en disco para evaluar la actividad, para ello, las muestras fueron dispersadas en agua para obtener cierta concentración en $\mu\text{g}/\text{disco}$. Las zonas de inhibición se midieron al final del periodo de incubación y que fue de 24 h a $35 \pm 2^\circ\text{C}$. Se empleó como referencia $50 \mu\text{g}$ ketoconazol de la marca Bio-Rad y se probaron en las mismas condiciones.

Preparación de SLN incorporadas en hidrogel.

El hidrogel fue preparado utilizando carbopol 940 (0.25 %). El polímero fue dispersado en agua deionizada con glicerol (1%) y se dejó humectando toda la noche. El glicerol se añadió con el fin de aumentar la estabilidad de la dispersión de las nanopartículas y controlar la formación del hidrogel. La dispersión de las SLN con ketoconazol que se incorporó fue del 1 % con una agitación de 300 rpm durante 5 minutos. El hidrogel fue ajustado a un pH de 7 (el pH inicial fue de 3.5) con gotas de trietanolamina. Este hidrogel fue almacenado en contenedores opacos a 4°C .

Resultados

Tamaño de partícula y potencial Z. Los resultados de la tabla 1 y 2, muestran que a mayor tiempo y velocidad de homogeneización se obtienen tamaño de partícula menores, los valores de potencial Z se encuentran en el intervalo de -12 y -17 mV. Se observa que en general las SLN con fármaco son más grandes que las SLN vacías. A la formulación optimizada y que corresponde a las muestras SLN_{V7} y SLN_{K7} se les determinó el tamaño de partícula durante aproximadamente 30 días, los resultados se muestran en la tabla 3, de acuerdo a éstos, hay un aumento del 43 % en el tamaño para las nanopartículas vacías, en tanto que las nanopartículas cargadas sufren un incremento del 25 %.

La figura 1 es una gráfica representativa de la distribución y tamaño de partícula de las nanopartículas lipídicas sólidas. Las mismas nanopartículas fueron visualizadas por microscopía electrónica de transmisión, en ella se observaron partículas esféricas en racimos con un tamaño promedio de 50 nm, tal y como puede apreciarse en la figura 2.

Tabla 1. Efecto del tiempo y velocidad de homogeneización en el tamaño de partícula de SLN vacías

Formulación	Estabilizante (%)	Tiempo de homogeneización (min)	Tamaño SLN-V (nm)	Potencial Z (mV)
SLN _{V1}	1.0	10	1667 ^a ±1.3	-16
SLN _{V2}			1297 ^b ±0.78	-12
SLN _{V3}		20	630 ^a ±0.16	-14
SLN _{V4}			465 ^b ±1.33	-15
SLN _{V5}	2.5	10	386 ^a ±0.24	-14
SLN _{V6}			290 ^b ±0.29	-14
SLN _{V7}		20	150 ^a ±0.30	-16
SLN _{V8}			76 ^b ±0.35	-12

a:10,000 rpm y b:20,000 rpm

Tabla 2. Efecto del tiempo y velocidad de homogeneización en el tamaño de partícula de SLN con fármaco

Formulación	Estabilizante (%)	Tiempo de homogeneización (min)	Tamaño SLN-K (nm)	Potencial Z (mV)
SLN _{K1}	1.0	10	>3,000 ^a	-16
SLN _{K2}			>2,000 ^b	-17
SLN _{K3}		20	711 ^a ±1.1	-14
SLN _{K4}			679 ^b ±0.53	-15
SLN _{K5}	2.5	10	456 ^a ±0.13	-12
SLN _{K6}			325 ^b ±0.48	-15
SLN _{K7}		20	189 ^a ±0.080	-16
SLN _{K8}			82 ^b ±0.75	-12

a:10,000 rpm y b:20,000 rpm

Tabla 3. Estabilidad preliminar de tamaño de partícula de SLN vacías y con ketoconazol

Formulación	Tiempo (semana)	Tamaño (nm)	Potencial Z (mV)
SLN vacías	1	70.1±	-16
	2	72.3 ±	-12
	4	99.3 ±	-14
SLN con ketoconazol	1	76 ±	-15
	2	82 ±	-14
	4	103.1 ±	-14

Figura 1. Distribución de tamaño de partícula de SLN por dispersión laser (Horiba, Particla LA 950)

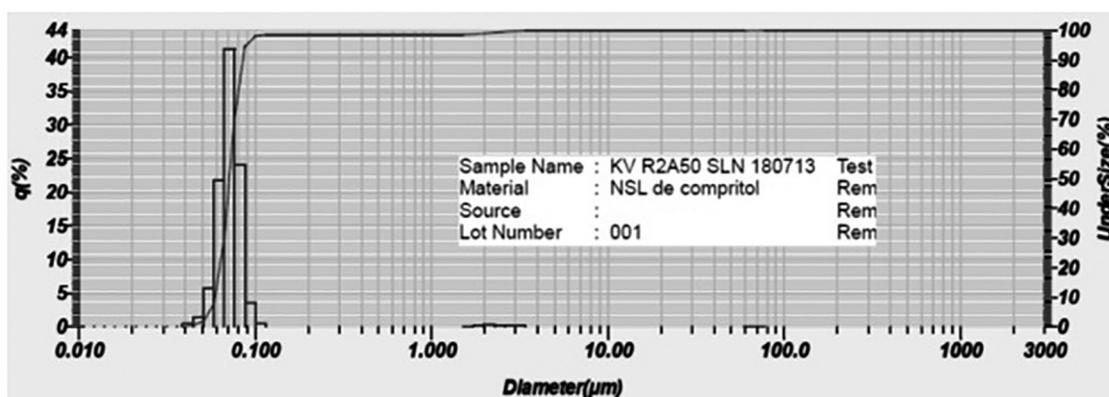
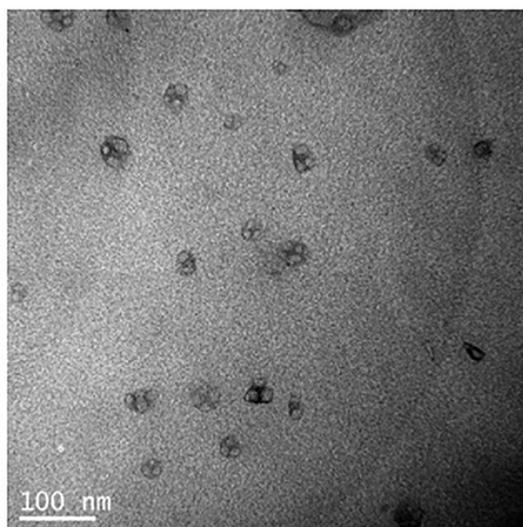


Figura 2. Microscopía electrónica de transmisión (HRTEM Jeol 2100F, Japón)



Antibiogramas SLN con ketoconazol. Las SLN presentaron mejor actividad antifúngica comparado con el ketoconazol comercial ya que generaron una mayor zona de inhibición, cuyo diámetro fue de 15 mm comparado con los 5 mm del ketoconazol comercial (tabla 4 y figura 3 I). Se muestran también los resultados obtenidos con muestras comerciales de ketoconazol en la figura 3 II.

Tabla 4. Actividad antifúngica de las SLN con ketoconazol

Diámetro de la zona de inhibición (mm)		
	50 µg(dw)/disco	100 µg(dw)/disco
SLN-K	15	17
SLN-V	0	0
Ketoconazol comercial	5	

Figura 3 I. Antibiograma con sensidiscos de ketoconazol en SLN, 50 ml/disco (A), 100 ml/disco (B) Sensidisco control de ketoconazol 50 µg/disco (C).

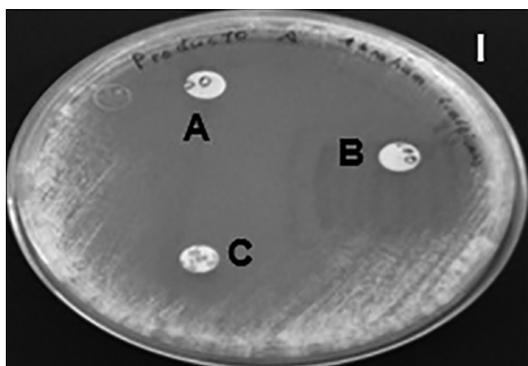
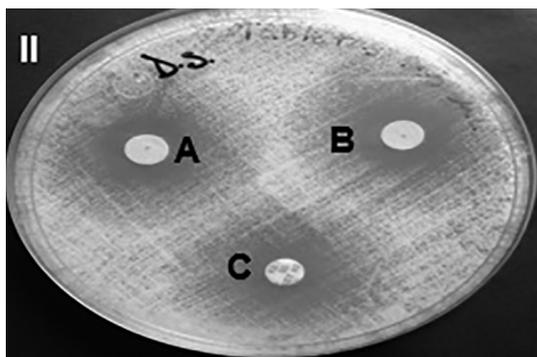


Figura 3 II. Antibiograma con sensidiscos de ketoconazol tabletas, 1 mg/disco (A, B), Sensidisco control de ketoconazol 50 µg/disco (C).



Discusión

El objetivo del presente trabajo fue formular y evaluar la actividad antifúngica del ketoconazol incluido en de SLN para la liberación por vía tópica del ketoconazol, en comparación con las prescritas en formulaciones convencionales. Para mantener una concentración alta y permitir una frecuencia baja de dosificación y cantidades bajas, el ketoconazol fue incluido en un sistema lipídico nanoparticulado. Para tal propósito, primero se diseñó un método para

generar nanopartículas lipídicas vacías, de tal forma que fuera posible obtener tamaños homogéneos, y de los diseños propuestos, se eligió el método de fusión-homogeneización en caliente. Una vez que se diseñó el método, se continuó con la incorporación del ketoconazol dentro de las nanopartículas lipídicas sólidas. La etapa siguiente fue caracterizar las nanopartículas en tamaño y potencial zeta, y en una última etapa, éstas se dispersaron en un gel de carbopol para darles mayor estabilidad. La formulación y las variables de proceso fueron optimizadas utilizando un diseño factorial completo para obtener partículas nanométricas.

El trabajo incluyó realizar múltiples experimentos, en primera instancia, la técnica para obtener nanopartículas y después de ello, variando el tipo y concentración de lípido (0.25 -1.0 %), tipo y concentración de emulsificante (1 - 5.0 %), además de variar el tiempo y velocidad de homogeneización.

Tamaño de partícula y potencial Z. En general, los resultados muestran que a mayor tiempo y velocidad de homogeneización, se obtienen menores tamaños de partícula, estos datos concuerdan con lo reportado en literatura (Niculae *et.al.*, 2012). Con respecto al emulsificante, el incremento del tamaño está ligado con el aumento de la concentración del emulsificante y de la viscosidad del medio. Esto puede atribuirse a que hay una disminución de la tensión superficial entre las fases orgánica y acuosa, que posiblemente permite la formación de pequeñas gotas de fase lipídica en el sitio de adición, lo cual da pie a una coalescencia y agregación debido a la viscosidad alta (Hu *et.al.*, 2005).

Sin embargo, un incremento en la concentración del emulsificante hasta 3.0 % aún generó tamaños nanométricos, pero una vez superado este límite no se observó disminución de las mismas (resultados no mostrados). De igual forma la sonicación ayudó a disminuir aún más el tamaño de partícula y a que la distribución fuera más estrecha, particularmente esto funcionó así hasta los ocho minutos, más allá de este tiempo no fue posible evaluarlo debido a que a mayor tiempo hubo aumento de la temperatura, y esto podría afectar la estabilidad del emulsificante.

Se sabe que por lo general el tamaño de partícula depende de muchos factores tales como la temperatura de proceso, velocidad de homogeneización, cantidad de estabilizante y contenido de fármaco (Varia, Dodiya, y Sawant, 2008). En este trabajo,

el tamaño de las nanopartículas con fármaco fue ligeramente mayor que las vacías, debido a la incorporación del fármaco dentro de la matriz lipídica. No se observó gran diferencia en el índice de polidispersidad entre las nanopartículas vacías y las cargadas con fármaco al utilizar las diferentes cantidades de tensoactivo, todos estuvieron en un intervalo aceptable, obteniéndose distribuciones monodispersas que son indicativo de la homogeneidad de la formulación.

Adicionalmente al emulsificante principal, poloxámero 407, se utilizó lecitina de huevo como cotensoactivo, pues se sabe que un tensoactivo por sí solo no es capaz de estabilizar las nanopartículas formadas, y por lo tanto una vez generadas, éstas se aglomeran, llevando a un incremento en el tamaño de partícula (Podaralla y Perumal, 2012), esto es debido a que los valores de HLB requeridos para emulsificar la mezcla de lípidos (Compritol y Precirol) están entre 2 y 5. Mientras que el valor de HLB de la lecitina es de 8 y el del poloxámero de 22, lo cual hace posible que se obtengan sistemas oleoacuosos. Con respecto al potencial Z, estos valores varían entre -12 y -16 mV, éstos se deben principalmente a la carga superficial que imparte la lecitina; en general se espera que las partículas pueden dispersarse establemente cuando su valor absoluto de potencial Z, es lo suficientemente alto y hay repulsión eléctrica entre ellas, sin embargo, no solo la carga superficial puede proporcionar estabilidad, también los estabilizantes de tipo polimérico pueden proporcionarla por medio de impedimento estérico entre las partículas, en este caso el poloxámero realizó esta función complementaria (Pugh y Fowkes, 1984; Pugh, Matsunaga y Fowkes, 1983), sin embargo para asegurar estabilidad éstas fueron liofilizadas.

Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM).

Los análisis de TEM confirmaron partículas de SLN esféricas, estas partículas se ven agregadas, esto puede observarse en la figura 2; a diferencia de la dispersión láser, la microscopía electrónica mostró que las partículas están compuestas de partículas más pequeñas, esta diferencia se debe a las condiciones de observación, en la dispersión láser se emplea muestras dispersas en un medio líquido, y las partículas se encuentran separadas y con un radio hidrodinámico adicional, lo cual hace que el tamaño de partícula parezca un poco mayor; por otra parte, en la microscopía electrónica de transmisión se hace uso de muestra previamente liofilizada, y por lo tan-

to cambian las condiciones (Bootz, Vogel, Schubert y Kreuter, 2004).

Antibiogramas SLN con ketoconazol. Los antibiogramas preliminares mostraron que las SLN presentan mejor actividad antifúngica comparado con el ketoconazol comercial ya que generaron una mayor zona de inhibición, cuyo diámetro fue de 15 mm comparado con los 5 mm del ketoconazol comercial, ambas muestras se probaron a una concentración de 50 µg/disco (tabla 2 y figura 3-I).

Con respecto a las formulaciones comerciales, se llevaron a cabo dos antibiogramas, utilizando discos con muestra comercial de Nizoral (ketoconazol) en dos diferentes presentaciones, tableta y suspensión con 1 mg/disco y 10 mg/disco respectivamente. Ambas formas farmacéuticas mostraron tener actividad antimicótica contra *C. albicans*. Los diámetros de las zonas de inhibición fueron las siguientes, para el fármaco en tabletas 5 mm y para la contenida en suspensión fue de 10 mm (figura 3-II).

Si se comparan los diámetros de las zonas de inhibición, el ketoconazol cargado en nanopartículas produjo un diámetro de 15 mm con solo 50 µg/disco, en tanto que el ketoconazol contenida en suspensión produjo un diámetro de 10 mm, pero con 10 mg/disco, es decir con 200 veces más del fármaco, por lo cual podemos concluir que el ketoconazol contenido en SLN mejora en 200 veces su eficacia en comparación con el ketoconazol incluido en formas farmacéuticas convencionales. Los resultados validan el supuesto inicial en el cual se ha observado que al incluir un fármaco en acarreadores nanométricos se mejora su actividad terapéutica, esto es resultado del gran área superficial que se crea en estos sistemas, por lo tanto hacen que las moléculas se encuentren libres para ejercer su actividad terapéutica, como se comprobó con los antibiogramas realizados (Briones, Isabel Colino y Lanao, 2008; Patro, 2013).

Formulación y caracterización de las SLN incorporadas en gel de carbopol.

El hidrogel fue preparado disolviendo 0.25 % de carbopol 940 en agua deionizada. La formulación optimizada de ketoconazol en SLN incluyó el Precirol/Compritol 888, lecitina de huevo y pluronic F128. Las nanopartículas cargadas fueron incorporadas con éxito en el hidrogel de carbopol con agitación mecánica y después fueron almacenadas a 4 °C por 12 horas para permitir la distribución homogénea dentro del hidrogel y de esta forma darles mayor estabilidad química.

Conclusión

Se diseñó un método de elaboración de nanopartículas lipídicas sólidas, cuyos tamaños oscilan entre 76 y 82 nm con un potencial Z de -14 mV; las microfotografías por microscopía electrónica de transmisión confirmaron nanopartículas más pequeñas con un diámetro promedio de 50 nm. Los antibiogramas realizados para comparar la actividad antifúngica del ketoconazol formulado en nanopartículas lipídicas sólidas, contra aquellas formuladas en formas farmacéuticas convencionales (tabletas y suspensión), mostraron que el ketoconazol formulado en nanopartículas lipídicas presenta una mayor actividad antifúngica, ya que produce mayores áreas de inhibición con menor cantidad del fármaco. Este hecho sugiere un gran potencial del sistema nanoparticulado lipídico para funcionar como un sistema de liberación tópica modificada del ketoconazol y de esta manera se podría mejorar la terapia contra las micosis cutánea. 

Referencias

- Bhaskar, K., Krishna-Mohan, C., Lingam, M., Jagan-Mohan, S., Venkateswarlu, V., Madhusudan-Rao, Y. y Ravichandran, V. (2009). "Development of SLN and NLC enriched hydrogels for transdermal delivery of nitrendipine: In vitro and in vivo characteristics". En: *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 35(1), 98-113.
- Boetz, A., Vogel, V., Schubert, D. y Kreuter, J. (2004). "Comparison of scanning electron microscopy, dynamic light scattering and analytical ultracentrifugation for the sizing of poly(butyl cyanoacrylate) nanoparticles". En: *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 57(2), 369-375. doi: 10.1016/S0939-6411(03)00193-0.
- Briones, E., Isabel Colino, C. y Lanao, J. M. (2008). "Delivery systems to increase the selectivity of antibiotics in phagocytic cells". En: *Journal of Controlled Release*, 125(3), 210-227. doi: 10.1016/j.jconrel.2007.10.027.
- Das, S., Ng, W. K. y Tan, R. B. H. (2012). "Are nanostructured lipid carriers (NLCs) better than solid lipid nanoparticles (SLNs): Development, characterizations and comparative evaluations of clotrimazole-loaded SLNs and NLCs?". En: *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 47(1), 139-151.
- Deng, X. Y. y Xia, Q. (2012). *Lipid nanoparticles as novel carrier for broad-spectrum sunscreen formulations*. Santa Clara, CA.
- Hu, F. Q., Jiang, S. P., Du, Y. Z., Yuan, H., Ye, Y. Q. y Zeng, S. (2005). "Preparation and characterization of stearic acid nanostructured lipid carriers by solvent diffusion method in an aqueous system". En: *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 45(3-4), 167-173. doi: 10.1016/j.colsurfb.2005.08.005.
- Huh, A. J. y Kwon, Y. J. (2011). "Nanoantibiotics: A new paradigm for treating infectious diseases using nanomaterials in the antibiotics resistant era". En: *Journal of Controlled Release*, 156(2), 128-145.
- Manual, T. M. (2013). Overview of Fungal Infections. En: <http://www.merckmanuals.com/home/sec17/ch197/ch197a.html>. Recuperado el 13 de octubre de 2013.
- Niculae, G., Lacatusu, I., Badea, N. y Meghea, A. (2012). "Lipid nanoparticles based on butyl-methoxydibenzoylmethane: In vitro UVA blocking effect". En: *Nanotechnology*, 23(31).
- Podaralla, S. y Perumal, O. (2012). "Influence of formulation factors on the preparation of zein nanoparticles". En: *AAPS PharmSciTech*, 13(3), 919-927. doi: 10.1208/s12249-012-9816-1.
- Pugh, R. J. y Fowkes, F. M. (1984). "The dispersibility and stability of carbon black in media of low dielectric constant. 2. Sedimentation volume of concentrated dispersions, adsorption and surface calorimetry studies". En: *Colloids and Surfaces*, 9(1), 33-46.
- Pugh, R. J., Matsunaga, T. y Fowkes, F. M. (1983). "The dispersibility and stability of carbon black in media of low dielectric constant. 1. Electrostatic and steric contributions to colloidal stability". En: *Colloids and Surfaces*, 7(3), 183-207.
- Sachin, J. y Vishal Gupta, N. (2013). "Solid lipid nanoparticles - Preparation, applications, characterization, uses in various cancer therapies: A review". En: *Research Journal of Pharmacy and Technology*, 6(8), 825-837.
- Varia, J. K., Dodiya, S. S. y Sawant, K. K. (2008). "Cyclosporine A loaded solid lipid nanoparticles: Optimization of formulation, process variable and characterization". En: *Current Drug Delivery*, 5(1), 64-69. doi: 10.2174/156720108783331069.
- Wang, Y., Zhu, L., Dong, Z., Xie, S., Chen, X., Lu, M., y Zhou, W. (2012). "Preparation and stability study of norfloxacin-loaded solid lipid nanoparticle suspensions". En: *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 98, 105-111.
- Yoon, G., Park, J. W. y Yoon, I. S. (2013). "Solid lipid nanoparticles (SLNs) and nanostructured lipid carriers (NLCs): Recent advances in drug delivery". En: *Journal of Pharmaceutical Investigation*, 43(5), 353-362. doi: 10.1007/s40005-013-0087-y.
- Zhang, L., Pornpattananangkul, D., Hu, C. M. J. y Huang, C. M. (2010). "Development of nanoparticles for antimicrobial drug delivery". En: *Current Medicinal Chemistry*, 17(6), 585-594.