



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

FACULTAS DE CIENCIAS

CARRERA BIOQUÍMICA Y FARMACIA

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DEL KETOCONAZOL PARA SU USO OFICIAL.

Trabajo de Integración Curricular

Tipo: Trabajo Experimental

Presentado para optar al grado académico de:

BIOQUÍMICO FARMACÉUTICO

AUTOR:

IVAN DANIEL PEÑAHERRERA MÁRQUEZ

Riobamba-Ecuador

2023



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

FACULTAS DE CIENCIAS

CARRERA BIOQUÍMICA Y FARMACIA

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DEL KETOCONAZOL PARA SU USO OFICINAL.

Trabajo de Integración Curricular

Tipo: Trabajo Experimental

Presentado para optar al grado académico de:

BIOQUÍMICO FARMACÉUTICO

AUTOR: IVÁN DANIEL PEÑAHERRERA MÁRQUEZ

DIRECTOR: BQF. JOHN MARCOS QUISPILLO MOYOTA

Riobamba-Ecuador

2023

© 2023, Iván Daniel Peñaherrera Márquez

Se autoriza la reproducción total o parcial, con fines académicos, por cualquier medio o procedimiento, incluyendo la cita bibliográfica del documento, siempre y cuando se reconozca el Derecho de Autor.

Yo, Iván Daniel Peñaherrera Márquez, declaro que el presente Trabajo de Integración Curricular es de mi autoría y los resultados del mismo son auténticos. Los textos en el documento que provienen de otras fuentes están debidamente citados y referenciados.

Como autor asumo la responsabilidad legal y académica de los contenidos de este Trabajo de Integración Curricular; el patrimonio intelectual pertenece a la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

Riobamba, 07 de diciembre del 2023




Iván Daniel Peñaherrera Márquez
060433432-6

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

FACULTAD DE CIENCIAS

CARRERA BIOQUÍMICA Y FARMACIA

El Tribunal del Trabajo de Integración Curricular certifica que: El Trabajo de Integración Curricular; Tipo: Trabajo Experimental, **EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DEL KETOCONAZOL PARA SU USO EN PREPARACIÓN OFICINAL**, realizado por el señor: **IVAN DANIEL PEÑAHERRERA MÁRQUEZ**, ha sido minuciosamente revisado por los Miembros del Tribunal del Trabajo de Integración Curricular, el mismo que cumple con los requisitos científicos, técnicos, legales, en tal virtud el Tribunal autoriza su presentación.

	FIRMA	FECHA
BQF. Gisela Alexandra Pilco Bonilla PRESIDENTE DEL TRIBUNAL		2023-12-07
BQF. John Marcos Quispillo Moyota DIRECTOR DEL TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR		2023-12-07
BQF. Diego Renato Vinuesa Tapia MSc. ASESOR DEL TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR		2023-12-07

DEDICATORIA

El presente trabajo es dedicado a la magna Facultad de Ciencias de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, que con su formación dieron la guía para el desarrollo de este trabajo, también a mi hijo para que el desempeño realizado en este trabajo sea una guía para él.

Iván

AGRADECIMIENTO

Primero agradecer a Dios que puso en el camino a las personas correctas, para la culminación de este trabajo, además del apoyo incondicional de mi familia en especial a mi mamá, también a Melissa Navarrete, cuyo apoyo en logística, recursos y métodos dieron paso al cumplimiento de este trabajo experimental.

Iván

INDICE DE CONTENIDOS

INDICE DE TABLAS.....	xi
INDICE DE ILUSTRACIONES	xii
INDICE DE ANEXOS	xiii
RESUMEN.....	xiv
ABSTRACT.....	xv
INTRODUCCIÓN	1

CAPÍTULO I

1. DIAGNÓSTICO DEL PROBLEMA	2
1.1. Planteamiento del problema	2
1.2. Justificación	2
1.3. Objetivos	3
<i>1.3.1. Objetivo general</i>	<i>3</i>
<i>1.3.2. Objetivos específicos</i>	<i>3</i>

CAPÍTULO II

2. MARCO TEÓRICO.....	4
2.1. Referencias Teóricas	4
<i>2.1.1. Hongos.....</i>	<i>4</i>
<i>2.1.2. Clasificación</i>	<i>4</i>
<i>2.1.3. Candida spp</i>	<i>6</i>
<i>2.1.4. Candidiasis</i>	<i>6</i>
<i>2.1.5. Antimicóticos</i>	<i>7</i>
<i>2.1.5.1. Mecanismo de acción del Ketoconazol.....</i>	<i>9</i>
<i>2.1.6. Evaluación de la actividad antimicótica</i>	<i>9</i>
<i>2.1.6.1. Concentración Mínima Inhibitoria.....</i>	<i>9</i>
<i>2.1.6.2. Concentración Mínima Fungicida.....</i>	<i>10</i>
<i>2.1.6.3. Método de microdilución.....</i>	<i>10</i>
<i>2.1.6.4. Método de macrodilución.....</i>	<i>10</i>
<i>2.1.6.5. Difusión en disco.....</i>	<i>10</i>
<i>2.1.7. Formulación Oficinal y Magistral</i>	<i>10</i>
<i>2.1.8. Formas farmacéuticas</i>	<i>11</i>

2.1.9. Geles.....	11
2.1.9.1. Ventajas.....	12
2.1.9.2. Desventajas.....	12

CAPÍTULO III

3. MARCO METODOLÓGICO.....	13
3.1. Tipo y diseño investigación.....	13
3.2. Materiales y Equipos.....	13
3.2.1. Material Biológico.....	13
3.2.2. Material Farmacológico.....	13
3.2.3. Materiales de Laboratorio.....	13
3.2.4. Equipos.....	14
3.2.5. Reactivos.....	15
3.3. Identificación de variables.....	15
3.3.1. Variable independiente.....	15
3.3.2. Variable dependiente.....	15
3.4. Descripción de los procesos.....	16
3.4.1. Fase 1.....	16
3.4.2. Fase 2.....	16
3.4.3. Fase 3.....	16
3.4.4. Fase 4.....	16
3.5. Técnicas y métodos.....	16
3.5.1. Preparación del medio de cultivo.....	16
3.5.2. Preparación de la solución madre de ketoconazol.....	17
3.5.3. Disoluciones de la solución madre de ketoconazol.....	18
3.5.4. Preparación de Inóculo.....	19
3.5.5. Inoculación y lectura de resultados.....	20
3.5.6. Preparación del Gel.....	21
3.5.7. Pruebas de Calidad.....	21
3.5.7.1. Parámetros organolépticos de la formulación.....	21
3.5.7.2. Control de los parámetros físicos y químicos.....	21
3.5.7.3. Análisis microbiológico.....	22

CAPÍTULO IV

4. ANALISIS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS.....	25
4.1. Concentración mínima inhibitoria y fungicida.....	25

4.1.1.	<i>Estándar McFarland</i>	25
4.1.2.	<i>Preparación del medio de cultivo</i>	25
4.1.3.	<i>Concentración de ketoconazol en las placas de microtitulación</i>	26
4.1.4.	<i>Preparación del Inóculo</i>	27
4.1.5.	<i>Lectura e interpretación de la CMI</i>	28
4.1.6.	<i>Determinación de la CMF</i>	28
4.2.	Interpretación de la CMI y CMF	29
4.2.1.	<i>Formulación del gel de Ketoconazol</i>	30
4.3.	Control de Calidad	31
4.3.1.	<i>Pruebas organolépticas</i>	31
4.3.2.	<i>Pruebas fisicoquímicas</i>	31
4.3.3.	<i>Pruebas microbiológicas</i>	33
	CONCLUSIONES	33
	RECOMENDACIONES	34
	BIBLIOGRAFÍA	
	ANEXOS	

INDICE DE TABLAS

Tabla 2-1: Divisiones en el Reino fungí.....	5
Tabla 2-2: Clasificación de los Antifúngicos	8
Tabla 2-3: Clasificación de las formas farmacéuticas	11
Tabla 3-1: Materiales utilizados en el laboratorio	13
Tabla 3-2: Equipos utilizados en el laboratorio	14
Tabla 3-3: Reactivos utilizados en el laboratorio	15
Tabla 3-4: Criterios de Incubación para cada microorganismo	23
Tabla 3-5: Interpretación de las placas	23
Tabla 4-1: Concentraciones inicial en $\mu\text{g/mL}$	26
Tabla 4-2: Formulación.....	30
Tabla 4-3: Características Organolépticas	31
Tabla 4-3: Parámetros fisicoquímicos	31
Tabla 4-4: Recuento microbiano	33

INDICE DE ILUSTRACIONES

Ilustración 3-1: Cálculo para la preparación de la solución madre	17
Ilustración 3-3: Representación de la dilución.....	18
Ilustración 3-4: Dilución 1/50 y llenado de placa	19
Ilustración 3-5: Cálculo para preparar NaCl 0.85%	19
Ilustración 3-6: Esquema de preparación del inóculo	20
Ilustración 4-1: Densidad Óptica	25
Ilustración 4-2: pH del medio de cultivo	26
Ilustración 4-3: Absorbancia del medio de cultivo	27
Ilustración 4-4: Cálculo del volumen a añadir de NaCl	27
Ilustración 4-5: Placa de microtitulación, con la CMI y CMF	28
Ilustración 4-6: Determinación de la CMF	29
Ilustración 4-7: Determinación de la extensibilidad	32
Ilustración 4-8: Determinación de la densidad	32

INDICE DE ANEXOS

ANEXO A: Certificado de autenticidad de la cepa de *C. albicans*

ANEXOS B: Preparación de los reactivos

ANEXOS C: Preparación del medio de cultivo

ANEXOS D: Preparación del Inóculo

ANEXOS E: Microdiluciones

ANEXOS F: Determinación de la CMI y CMF

ANEXOS G: Elaboración del gel

ANEXOS H: Control de calidad

RESUMEN

El presente trabajo tuvo como objetivo el evaluar la actividad antifúngica del ketoconazol para su uso en preparación oficial, para ello se determinó la concentración mínima inhibitoria y mínima fungicida del ketoconazol in-vitro frente a una cepa de laboratorio de *Candida albicans* con el método de microdilución para levaduras descrita por Clinical & Laboratory Standards Institute en el documento M27 A, obteniendo como resultado que el microorganismo es medianamente sensible al ketoconazol, siendo factible la elaboración de un preparado oficial o magistral del mismo. Para la formulación se tomó en cuenta las características necesarias que debe tener el preparado para una infección micótica en la piel, por lo que se eligió al carbopol 940 como la base del gel, propilenglicol como cosolvente, al EDTA como agente antioxidante y una concentración al 2% de ketoconazol; finalmente se realizó el control de calidad siguiendo las técnicas descritas por la USP (2010); donde se analizó las características organoléptica como el color, olor, presencia de grumos, consistencia y fisicoquímicos como pH, densidad y extensibilidad, obteniendo resultados positivos en cada análisis; para los parámetros microbiológicos se usó las placas petrifilm para *Staphylococcus aureus*, aerobios mesófilos, hongos y levaduras, para *Pseudomona auroginosa* se realizó una incubación en agar sangre; en todos los análisis microbiológicos no hubo crecimiento bacteriano o fúngico, concluyendo que la formulación oficial realizada en este trabajo experimental cumple con todos los parámetros de seguridad y eficacia para su uso.

Palabras clave: <BIOQUÍMICA Y FARMACIA>, <CLSI M27 A>, <KETOCONAZOL>, <CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA>, <CONTROL DE CALIDAD>, <*Candida albicans*>, <PETRIFILM>, <PREPARADO OFICIAL>, <PREPARADO MAGISTRAL>.

0181-DBRA-UPT-2024



ABSTRACT

The objective of this research was to evaluate the antifungal activity of ketoconazole for its use in officinal preparation. With this purpose, the minimum inhibitory and minimum fungicidal concentration of ketoconazole in-vitro against a laboratory strain of *Candida albicans* was determined with the microdilution method for yeasts, which was described by Clinical & Laboratory Standards Institute in the document M27 A. The result was that the microorganism is moderately sensitive to ketoconazole, being feasible for the elaboration of an officinal or magistral preparation. For the formula, the necessary characteristics that the preparation must have for a mycotic infection in the skin were taken into account. Therefore, carbopol 940 was chosen as the base of the gel, propylene glycol as cosolvent, EDTA as an antioxidant agent, and a 2% concentration of ketoconazole. Finally, quality control was performed following the techniques described by the USP (2010); where the organoleptic characteristics such as color, odor, presence of lumps, consistency, and physicochemical characteristics such as pH, density, and extensibility were analyzed. It obtained positive results in each analysis. For the microbiological parameters, petrifilm plates were used for *Staphylococcus aureus*, mesophilic aerobes, fungi, and yeasts. For *Pseudomonas aeruginosa*, incubation in blood agar was performed. In all microbiological analyses, there was no bacterial or fungal growth, concluding that the official formula carried out in this experimental work, complies with all the safety and efficacy parameters for its use.

Keywords: <BIOCHEMISTRY AND PHARMACY>, <CLSI M27 A>, <KETOCONAZOL>, <MINIMUM INHIBITORY CONCENTRATION>, <QUALITY CONTROL>, <*Candida albicans*>, <PETRIFILM>, <OFFICIAL PREPARATION>, <MAJOR PREPARATION>.

0181-DBRA-UPT-2024



Ing. Romel Francisco Calles Jiménez Ms.
C.I. 0603877713

INTRODUCCIÓN

Paracelso, en el siglo XVI, llegó a la siguiente conclusión: "Todo es veneno y nada es veneno, sólo la dosis hace el veneno", sin duda una afirmación que llegó a dar un cambio en como comprendemos la química farmacéutica, independientemente de su naturaleza, dio paso al desarrollo de medicamentos en todo tipo de formas; comenzó la necesidad de encontrar esta dosis adecuadas en que las sustancias químicas beneficiosas para los tratamientos médicos; el ensayo y error ha sido necesario en los años para el descubrimiento de nuevos principios activos. Además, podemos ayudar con mayor versatilidad a las sustancias ya conocidas (Lopez et al., 2018).

La búsqueda de establecer métodos adecuados para la evaluación de la actividad de cada principio activo ha llevado a técnicas estandarizadas que sean factibles de reproducir, las propuestas por Clinical Laboratory Standard Institute "CLSI", y la Sociedad Europea de microbiología Clínica y Enfermedades Infecciosas "EUCAST", han definido las metodologías, condiciones e implementos necesarios para la evaluación de la actividad antimicótica, necesario para tratar las nuevas olas de resistencia fúngica (Drommund, 2018).

En Ecuador las investigaciones de formulaciones tanto magistrales como oficinales no tienen apoyo, principalmente por los altos costos que estos implican, además de no disponer con todos los materiales y equipos necesarios en el país; desde otro punto de vista, la necesidad de brindar mayor variedad a los tratamientos a la población va aumentando, los tratamientos generalizados ya no están siendo totalmente efectivos y se busca una medicina más personalizada, el uso va desde hospitales donde la elaboración de preparados es necesario cuando hay pacientes especiales que necesiten su tratamiento; también poder elaborar y dispensar en boticas autorizadas (Sanailán 2019).

CAPÍTULO I

1. DIAGNÓSTICO DEL PROBLEMA

1.1. Planteamiento del problema

La información acerca de formulaciones en el país es muy escasa considerando que no se cuenta con un Formulario Nacional, lo que conlleva a la revisión de bibliografía de otros países, la necesidad de ampliar los conocimientos y de la base de datos nacionales fomenta la investigación, considerando una base legal que se debe reforzar aún en el país, para el control y preparación de formulaciones (Sanailán, 2019).

Las infecciones micóticas cutáneas también llamadas dermatofitosis, son muy comunes y motivo de consulta, estas infecciones causadas por hongos afectan tejido queratinizado como piel, cuero cabelludo y uñas, para la Organización Mundial de la Salud (OMS) cerca del 20% de toda la población a nivel mundial padece algún tipo de micosis, de las cuales más del 70% es por *Candida albicans* (España, 2019; Martha, 2018).

Al momento de tratar de algunas patologías de poca incidencia en la población como las micosis cutáneas, que los medicamentos que se encuentran en el mercado no cubren esta necesidad, es gracias a la implementación de la formulación tanto magistral como oficial en los hospitales y centros farmacéuticos especializados, que se trata de solucionar las dermatofitosis. En el Ecuador; no se logra establecer su prevalencia, o determinar el agente causal, debido al poco registro de consulta médica y de diagnóstico de laboratorio (España, 2019; Sanailán, 2019).

1.2. Justificación

En Ecuador hay una búsqueda por el avance en la formulación magistral y oficial, en el Hospital General Docente de Calderón se implementó un laboratorio de farmacotécnica avanzado en el país, gracias a esto se ha logrado un aumento de la eficiencia, optimización de las materias primas y productos terminados, esto se debe a que por cada especificación que necesite el paciente los preparados se elaboran en las cantidades solicitadas por los profesionales de la salud (Peñaherrera, 2019).

La importancia de que un país pueda desarrollarse en un área tan importante como es la formulación magistral y oficial, además de la evaluación de la sensibilidad de los principios

activos frente al paciente o al microorganismo, todos estos puntos favorece a que la atención al paciente sea más beneficiosa, ayudando a las necesidades, más aun contando con los beneficios hospitalarios como la optimización de medicamentos, asegurando siempre la calidad, efectividad y la seguridad al paciente (Garca Salom & Alonso Herreros, 2010).

El sistema de salud del país tiene una falencia al momento de cumplir los objetivos terapéuticos de los pacientes, gran parte se debe a la baja variedad de medicamentos para ciertas patologías que se encuentra en stocks, a pesar que su tratamiento no es complicado de tratar, no se cuenta con las concentraciones o la forma farmacéutica adecuada, considerando que se tiene el principio activo si está disponible; con esta problemática se vuelve necesario el desarrollo de la formulación magistral y oficial, ayudando tanto a los pacientes como profesionales de la salud, aumentando la recuperación de los tratamientos más específicos y no depender solo de la oferta de la industria (Carlucci, 2017).

1.3. Objetivos

1.3.1. *Objetivo general*

Evaluar la actividad antifúngica del ketoconazol para su uso en preparación oficial.

1.3.2. *Objetivos específicos*

- Identificar la concentración mínima inhibitoria y la mínima fungicida de ketoconazol mediante el método de microdilución.
- Elaborar preparados oficinales en gel de ketoconazol con la concentración mínima fungicida y mínima inhibitoria.
- Realizar el control de calidad de los preparados oficinales en gel.

CAPÍTULO II

2. MARCO TEÓRICO

2.1. Referencias Teóricas

2.1.1. *Hongos*

Los hongos son formadores de 1 de los 5 grandes reinos (fungí) el cual alberga a más 100 mil especies conocidas por el hombre, su capacidad de supervivencia es excepcional llegando a inactivarse por varios periodos de tiempo y cuando presenten las condiciones adecuadas volver a desarrollarse, generando también mecanismo de defensa frente a bacteria y otros depredadores (Alonso, 2018).

Son organismos que poseen grandes características morfológicas que en la antigüedad no lograban clasificarla con claridad, son microorganismos que cuentan con células eucariotas, es decir poseen núcleo definido donde se encuentra su material genético, pertenecen al dominio eukarya y al reino fungí, poseen al igual que las plantas una pared celular constituida principalmente por un polisacárido (quitina), que les permite sobrevivir a condiciones extremas como la lisis osmótica o de metabolitos tóxicos, también le ayuda a la permeabilidad de nutrientes para su funcionamiento (Bertolini et al., 2018; Restrepo et al., 2019).

Esta pared les confiere una baja movilidad celular por lo que se le solía agrupar en el reino plantae, gracias al estudio más detallado de los hongos se comprendió que los hongos son seres heterótrofos, ya que obtienen su alimento de materia orgánica que consumen del ambiente a diferencia de las plantas que lo sintetizan metabolizando el dióxido de carbono y agua, además de usar glucagón como molécula de reserva de energía a diferencia de las plantas que utilizan almidón.

2.1.2. *Clasificación*

La primera clasificación se da por taxonomía, el reino fungí tiene 5 divisiones generales, las cuales abarcan a todas las especies de hongos que se conocen en la actualidad, estas se han agrupado por varias características físicas y bioquímicas, en la tabla 2-1 se detalla la información de las divisiones (Alonso, 2018; Martinez et al., 2019).

Tabla 2-1: Divisiones en el Reino fungí

División	Características
Chytridiomycota	Poseen esporas flageladas (zoosporas), viven en ecosistemas acuáticos, son microscópicos.
Zygomycota	Forman esporas capaces de soportar condiciones extremas (zigosporas), tienen crecimiento macroscópico en forma de hifas.
Glomeromycota	Tienen asociaciones simbióticas con plantas (micorrizas), les ayuda a intercambiar nutrientes.
Ascomycota	Se reproducen por ascos, que son estructuras que albergan a las esporas en el micelio del hongo.
Basidiomycota	Desarrollan setas, las cuales son las encargadas de liberar las esporas para su reproducción.

Fuente: (Alonso, 2018; Martínez et al., 2019)

Realizado por: Peñaherrera Iván, 2023

Se debe tomar en cuenta que también se dividen los hongos de acuerdo con su forma de crecimiento, es decir cómo se presentan a la vista de los observadores, así tenemos a tres tipos de hongos: las levaduras, mohos y zetas (Bertolini et al., 2018; Suárez & Peñaranda, 2022).

Las levaduras son hongos unicelulares los cuales se puede identificar su forma únicamente al microscopio, existen muchos tipos de levaduras, algunas han ayudado a la humanidad gracias a su capacidad de fermentación por su síntesis de energía en anaerobiosis, dando aportes a la producción de masas y bebidas alcohólicas (Zambrano, 2018).

Los filamentosos o mohos se caracterizan por presentar un crecimiento en micelio, dando la apariencia similar a pelos, son los que más se encuentra en el ambiente, contaminando gran parte de materia orgánica comestible, son en su mayoría tóxicos para el ser humano, pero sin duda han aportado grandes avances a la humanidad gracias al *Penicillium spp*, que fue el primer hongo en demostrar que tiene actividad antibiótica, a partir de este se ha podido desarrollar la penicilina y sus derivados (Suárez & Peñaranda, 2022).

Las zetas, son los hongos que crecen en la tierra y suelen brotar en su forma particular como de sombrilla, algunos nacen a partir de micorrizas y algunos tienen como mecanismo de defensa la producción de toxinas, las cuales tienen efectos nocivos o alucinógenos, pocos son los que consideramos comestibles, entre ellos tenemos a los champiñones (*Agaricus bisporus*) y a los shitake (*Lentinula edodes*).

El reino fungí al igual que los otros reinos tienen muchas características diferentes entre sí, la forma de diferenciarlos de otros microorganismos es a través de un microscopio, a la vez poseen

tantas diferencias entre las abundantes especies, una diferencia fundamental que tienen los hongos es la alimentación, que cambia de una especie a otra y tenemos tres tipos:

- Saprofítico. – Se alimentan principalmente de materia orgánica muerta.
- Simbiótico. – Crecen de manera conjunta con otro organismo.
- Parasitario. – Consume los nutrientes de otro organismo y le causan daños.

2.1.3. *Candida spp*

Es una levadura saprofitica, que suele encontrarse de forma natural en la piel y mucosas del cuerpo humano, capaz de desarrollarse de forma distinta a diferentes temperaturas, a 37 °C como levadura y 25°C tiene una apariencia filamentosa, se reproduce de forma asexual por gemación (Vieille O., 2022).

Taxonomía:

- Reino: Hongo
- División: Aschomycota
- Clase: Saccharomycetes
- Familia: Saccharomycetaceae
- Género: *Candida*
- Especies: *albicans*

Sus características morfológicas se pueden observar a través del microscopio teniendo una forma redonda de 3 a 8 micrómetros de largo, en su forma filamentosa sus células se alargan y presentan pseudo hifas; su crecimiento en placa se caracteriza por colonias de color blanco hueso, presentan una forma redonda y lisas, los medios de cultivo habituales para su crecimiento son: Sabouraud y Potato Dextrosa Agar (Rodríguez et al., 2010).

2.1.4. *Candidiasis*

Es el término usado para referirse a todas las infecciones causadas por la especie *Candida albicans*, Esta es la especie fúngica más común causante de enfermedad en humanos. *C. albicans* causa varios tipos de infecciones, que pueden ser divididas en tres grupos: mucosas, sistémicas y cutáneas (Taudorf et al., 2019).

Las infecciones mucosas se presentan comúnmente en mujeres por lo demás sanas en forma de candidiasis vulvovaginal (aftas). Se estima que hasta un 75% de mujeres adultas experimentará una vez en su vida esta infección. *C. albicans* también puede colonizar la cavidad oral (candidiasis oral) y puede ser un problema en los recién nacidos y en la vejez (Taylor et al., 2019).

La infección sistémica, o candidiasis diseminada, es una enfermedad mucho más seria. Ocurre cuando un paciente está inmunocomprometido (debido a medicamentos inmunosupresores, quimioterapia o neutropenia) y *C. albicans*, que normalmente es mantenida bajo control por el sistema inmunitario, invade tejidos y entra en el torrente sanguíneo. *C. albicans* reside comúnmente en el intestino humano, por lo que la invasión de las paredes del intestino por este hongo (por ejemplo, por úlceras o heridas) puede ser una vía de inicio de la candidiasis (Rodríguez et al., 2010; Taudorf et al., 2019).

Además, *C. albicans* también es capaz de crecer en equipamiento médico, como catéteres intravenosos, y es otra vía por la que los pacientes pueden quedar expuestos a ella mientras se encuentra en el hospital (Drommund, 2018; D. Medina, 2016).

2.1.5. Antimicóticos

La actividad antimicótica es una propiedad de varias sustancias orgánicas o inorgánicas para poder inhibir el crecimiento de hongos, se conoce dos tipos de acciones frente a estos microorganismos que son la fungicida y fungistática, depende de cada sustancia cual es la forma en la que atacan al hongo; el estudio de esta actividad comenzó con el uso de plantas para tratar diversas enfermedades, la farmacognosia como se le conoce a este estudio, ha dado espacio al entendimiento de cómo tratar las enfermedades de diferente tipo, gracias a estos saberes ancestrales es que se han desarrollado por procesos tecnológicos y químicos la identificación de los principios activos (p.a.), que son las sustancias encargadas de las diferentes actividades, entre ellas la antimicótica (Vázquez & Peralta, 2015).

El desarrollo de la farmacología como ciencia marco el avance de la tecnología para la adaptación de los p.a. a una forma más compacta y simple (forma farmacéutica), en adición conjunta con otras sustancias que le ayude a mejorar sus propiedades físicas y químicas (excipientes) permitiendo una fácil administración, a esta forma farmacéutica se le conoce como medicamento (Fikri, 2023).

Los diferentes medicamentos antinómicos se los clasifica en función de su estructura química, su tipo de acción y si dependen de la concentración o del tiempo de acción, se describe en la tabla 2-2.

Tabla 2-2: Clasificación de los Antifúngicos

Tipo	Sitio de acción	Subtipo	Antimicóticos
Polienoles	Membrana celular	-	Nistatina, Natamicina, Anfotericina b
Azoles	Membrana celular	Imidazoles	Miconazol, clotrimazol
		Triazoles	Fluconazol, itraconazol, ketoconazol
		Triazoles 2da generación	Voriconazol, ravuconazol, posaconazol
Alilaminas	Membrana celular	-	Terbinafina, naftifina
Lipopéptidos	Pared celular	Equinocandinas	Caspofungina, anidulofungina, micafungina
Pirimidas fluoradas	Núcleo	-	Flucitosina
Otros	Pared celular	-	Yoduro de potasio, ciclopirox, tolnaftato, griseofulvin

Fuente: (Velasteguí, 2022; Zambrano, 2018)

Realizado por: Peñaherrera Iván, 2023

Cada grupo de antifúngico tiene su propio mecanismo de acción, los cuales se basan en su estructura y donde actúan, como se explicó anteriormente, a continuación, se detalla su mecanismo de acción (Vázquez & Peralta, 2015):

- Polienosos se unen al ergosterol presente en la membrana celular, donde alteran la permeabilidad de la membrana a través de la formación de poros, lo que causa la pérdida de proteínas, lípidos y iones, causando la muerte celular.
- Azoles inhiben a la CYP P4503A, a través de la inactivación de la enzima C-14-a-dimetilasa, lo que provoca que no sintetice ergosterol en la membrana celular, gracias a esto se comienzan a acumular esteroides tóxicos intermedios, aumenta la permeabilidad de la membrana y se interrumpe el crecimiento del hongo.
- Alilaminas son parecidos a los azoles, conceptualmente ellas inhiben la síntesis del ergosterol, pero no actúan en el CYP P4503A, estas inhiben a la enzima escualeno epoxidasas disminuyendo la concentración de ergosterol y aumentan la de escualeno, aumentando la permeabilidad de la membrana celular, causando finalmente la disminución del crecimiento celular.

- Lipopéptidos son capaces de inhibir la síntesis de glucanos, bloqueando la acción de la enzima 1,3-beta-glucano sintetasa, causando que la célula fúngica se da frente a la presión osmótica y muera.

2.1.5.1. Mecanismo de acción del Ketoconazol

El ketoconazol es un derivado dioxolano, imidazol sintético, que actúa como fungistático o fungicida (a dosis elevadas) impidiendo la síntesis de ergosterol (por inhibición de la enzima lanosterol 4-alfa dimetilasa dependiente del citocromo P-45032) alterando la permeabilidad de la membrana fúngica, es activo frente a dermatofitos como *Trichophyton* spp., *Epidermophyton* spp., *Microsporum* spp. y frente a levaduras como *Candida* spp. y *Malassezia* spp. (*Pityrosporum* spp.) (CIMA, 2010; Rivas et al., 2016).

2.1.6. Evaluación de la actividad antimicótica

A medida que la industria farmacéutica fue introduciendo en el mercado nuevos antifúngicos o nuevas formulaciones de los ya conocidos, se hizo necesaria la realización de pruebas de sensibilidad con el fin de comparar la actividad de estos y detectar las posibles resistencias. Motivado por esta nueva realidad, el “Clinical Laboratory Standard Institute” (CLSI, antes NCCLS) realizó encuestas y evaluaciones a diferentes laboratorios, se dieron cuenta de los resultados y métodos muy diferentes entre cada uno. La Sociedad Europea de Microbiología Clínica y Enfermedades Infecciosas (ESCMID), buscaron llegar a consensos cada uno en su continente, para lograr estandarizar en sus guías diferentes pruebas que ayuden a la identificación de la actividad antimicótica, a través de la concentración mínima inhibitoria (CMI), que es la concentración mínima de ketoconazol que permite inhibir el 50 % del crecimiento (Sánchez et al., 2017; Tligui et al., 2018; UBE, 2020).

2.1.6.1. Concentración Mínima Inhibitoria

Conocida mejor por las siglas CMI, es la cantidad mínima de antifúngico o antibiótico que permite una disminución de crecimiento del microorganismo analizado, tiene como unidades de medida $\mu\text{g/ml}$, se utiliza esta concentración directamente como la que debe estar a nivel sérico, es decir en la sangre, por lo que es utilizado en gran medida para calcular también las dosis y el tiempo que debe ser administrado el antifúngico, en fármacos tiempo dependiente (CLSI, 2007; Musto et al., 2013; UBE, 2020).

2.1.6.2. Concentración Mínima Fungicida

Es la concentración mínima de antifúngico que impide el crecimiento del 100% del microorganismo, sus siglas son CMF, al igual que la CMI tiene como unidades de medida $\mu\text{g/ml}$, también se interpreta como una concentración sérica y se utiliza en los fármacos que son dosis dependiente (Sánchez et al., 2017).

2.1.6.3. Método de microdilución

La técnica estandarizada se basa en la dilución del antifúngico, usando placas de microtitulación, que permiten un volumen final de 200 microlitros, permite a su vez analizar hasta 8 sepas diferentes en una misma placa, la concentración de la solución madre de antifúngico debe ser cien veces mayor a la concentración más alta que se va analizar, usa como medio de cultivo el RPMI 1640 con glutamina y sin bicarbonato sódico tamponado con ácido morfolino propano sulfónico, se analiza frente a *Candida albicans* en una concentración de 0.5McFarland, se realiza una lectura visual de la turbidez de los pocillos, determinando la CMI.

2.1.6.4. Método de macrodilución

Esta técnica utiliza la misma formulación para el medio de cultivo y la solución madre de antifúngico que el método de microtitulación, se diferencia en que utiliza tubos estériles de 11x70 mm, que ocupan un volumen final de 1 ml, la lectura se realiza de manera virtual observando la turbidez, identificando la CMI (CLSI, 2007).

2.1.6.5. Difusión en disco

Es el mismo método para bacterias que para hongos, está basado en el estudio de la sensibilidad de las levaduras, medido por un halo de inhibición que tiene estandarizado cuales son los límites para la CMI, a la vez se puede interpretar directamente si el microorganismo es sensible, o resistente; utiliza Muller Hilton como medio de cultivo (CLSI, 2007).

2.1.7. Formulación Oficinal y Magistral

La fórmula magistral (FM) es el medicamento que elabora un especialista en farmacología luego de recibir las instrucciones específicas de un médico, siendo específica para el paciente al que se lo prescribe, la formulación officinal (FO) son preparados que ya tienen una formula específica que son reproducibles y sirven para la población en general, cada país suele tener registrado cada formulación autorizada en un formulario nacional (Fernandez et al., 2019).

La parte encargada de la formulación es el área de farmacotécnica que centra su actividad en la elaboración y control de FM y FO adecuadas a las necesidades de pacientes hospitalizados y pacientes ambulatorios con objeto de proporcionar, en cualquier momento y con independencia de las necesidades del mercado, aquellas formas de dosificación adecuadas. Existen básicamente dos tipos de formulaciones: las estériles y no estériles, las que necesitan estériles son todas aquellas formas farmacéuticas de uso parenteral, que pasan de forma rápida a circulación, en cambio las no estériles deben pasar primero por una barrera que es la epidermis y no permite el paso a microorganismos en el mejor de los casos (Barrachida, 2019; Rivas et al., 2016).

2.1.8. *Formas farmacéuticas*

Con el pasar de los años se ha visto la necesidad de tener distintas presentaciones para los tratamientos, se conoce como forma farmacéutica a las diferentes maneras en las que se pueden disponer de los medicamentos, cada una tiene una utilidad específica. Son clasificados por su estado físico y su vía de administración, se detalla en la tabla 2-3 (Fernandez et al., 2019; Lopez et al., 2018).

Tabla 2-3: Clasificación de las formas farmacéuticas

Clasificación	Tipo	Ejemplos
Estado físico	Sólidos	Comprimidos, polvos
	Semisólidos	Pastas, cremas, geles
	Líquidas	Jarabes, Suspensiones
Vía de administración	Parenteral	Ampollas inyectables
	Tópica	Cremas, geles, pomadas
	Inhalatoria	Líquidos para nebulización
	Oral	Capsulas, comprimidos
	Sublingual	Comprimidos sublinguales
	Rectal	Edemas
	Vaginales	Óvulos vaginales
	Oftálmico	Colirios
	Otíco	Líquidos óticos

Fuente: (de Diego & del Arco, 2016; Pabón, González, et al., 2017)

Realizado por: Peñaherrera Iván, 2023

2.1.9. *Geles*

Los geles son formas farmacéuticas semisólidas que están formadas por un agente gelificante que constituyen la base de la formulación a la vez, que es necesario el uso de cosolventes para la

dispersión del Pa (del Arco, D., 2016; Pabón, González, et al., 2017).

Su principal característica es ser libres de grasa o presentar bajas cantidades de ella. Por lo tanto, se emplean preferentemente en afecciones dermatológicas como:

- Secreción sebácea como el acné.
- Lesiones como las heridas o abrasiones.
- Lesiones con inflamación que necesiten la pérdida de calor.

2.1.9.1. Ventajas

Estas formas semisólidas más utilizadas porque presentan una serie de ventajas sobre la piel y heridas, tales como (Lopez et al., 2018):

- Buena tolerancia al ser constituidos principalmente por agua, que es inerte.
- Ayudar a la frescura de las heridas al favorecer la pérdida del agua a través de la piel, a la vez que deja muy pocos residuos en esta.
- Poseen una buena extensibilidad.

2.1.9.2. Desventajas

Sin embargo, tal como sucede en otras formas farmacéuticas, los hidrogeles también presentan algunas desventajas (Lopez et al., 2018; Pabón, González, et al., 2017).

- Al carecer de fase apolar son menos versátiles, al momento de diluir Pa hidrofóbicos.
- Muchos geles pierden su estructura en presencia de iones. Generalmente cuanto más peso molecular más aumenta su viscosidad del agente gelificante y menos resistencia tiene a los electrolitos.
- La estabilidad se puede ver afectada por los cambios de pH, siendo necesario que se estabilice bien en un pH ácido, logrando que no pierda la consistencia o su estructura.

CAPÍTULO III

3. MARCO METODOLÓGICO

3.1. Tipo y diseño investigación

Esta investigación tiene un diseño experimental de tipo cuantitativo y de alcance correlacional, debido a que se trabajó en la determinación de las concentraciones mínima fungicida y mínima inhibitoria del ketoconazol frente a una cepa aislada del *Candida albicans* mediante la técnica de CLSI para la determinación de la actividad antifúngica de principios activos, con la finalidad de elaborar geles de ketoconazol.

3.2. Materiales y Equipos

3.2.1. Material Biológico

Se utilizó una cepa de *Candida albicans* previamente aislada e identificada por el laboratorio de microbiología clínica de la Facultad de ciencias de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, como organismo frente al actuará el ketoconazol.

3.2.2. Material Farmacológico

Se utilizó comprimidos de ketoconazol 200 mg como materia prima para la elaboración del gel y la determinación de la concentración mínima inhibitoria y mínima fungicida.

3.2.3. Materiales de Laboratorio

Tabla 3-1: Materiales utilizados en el laboratorio

Procedimiento	Materiales
Preparación del inóculo y las microdiluciones del ketoconazol	Vaso de precipitación
	Placas Petri de vidrio
	Matraz Erlenmeyer
	Vidrio Reloj
	Espátula
	Termómetro
	Malla de asbesto
	Reverbero
	Probeta de 50 mL

	Mortero
	Pistilo
	Tubos de Ensayo
	Gradilla
	Pipeta automática de 100 µL
	Pipeta automática de 10 µL
	Guantes estériles
	Malla de asbesto
	Placa de micro titulación
	Tubos de ensayos
	Gradilla
Análisis de la concentración mínima Inhibitoria y mínima fungicida	Pipeta automática de 1000 µL
	Pipeta automática de 100 µL
	Pipeta automática de 10 µL
	Guantes estériles
	Filtro 0,22 µm de poro
	Vasos de precipitación de 250 y 500 mL
	Pipetas graduadas de 5 y 10 mL
Elaboración del gel	Varillas de agitación
	Probetas de 50 mL
	Frascos ambar de 100ml
	Placas Petri
	3M™ Placas Petrifilm™ Staph Express
	3M™ Petrifilm™ para Recuento Aerobios
Control de calidad	3M™ Placas Petrifilm™ para Recuento de Enterobacterias
	3M™ Petrifilm™ Placa Recuento Hongos y Levaduras
	Vaso de precipitación de 30 mL
	Picnómetro

Realizado por: Peñaherrera I., 2023

3.2.4. Equipos

Tabla 3-2: Equipos utilizados en el laboratorio

Análisis	Materiales
Evaluación de la actividad antimicótica por el método de microdilución	Balanza analítica
	Cámara de flujo laminar
	Autoclave

Elaboración del gel	Balanza analítica
	Cámara de flujo laminar
Control de calidad y estabilidad	Incubadora
	pH-metro
	Refrigeradora

Realizado por: Peñaherrera I., 2023

3.2.5. Reactivos

Tabla 3-3: Reactivos utilizados en el laboratorio

Análisis	Materiales
Evaluación de la actividad antimicótica por el método de microdilución	Dimetil Sulfoxido 99,9%
	Agua destilada
	Medio de cultivo RPMI con glutamina y sin bicarbonato de sodio
	Medio de cultivo Muller Hilton
	Cloruro de Sodio
	Ácido morfolino propano sulfónico
Elaboración del gel	Agua destilada
	Carbopol
	EDTA
	Ketoconazol
	Propilenglicol
Control de calidad	Agua destilada
	Agua de peptona

Realizado por: Peñaherrera I., 2023

3.3. Identificación de variables

3.3.1. Variable independiente

Concentraciones de Ketoconazol.

3.3.2. Variable dependiente

Crecimiento de *Candida albicans* en el medio de cultivo.

3.4. Descripción de los procesos

3.4.1. Fase 1

Se realizó la preparación de la solución madre de ketoconazol, para después hacer las disoluciones necesarias para tener las concentraciones que indica la técnica y se colocaron en la placa de microtitulación, a la par se preparó el inóculo de *Candida albicans*, haciendo una suspensión en el medio de cultivo RPMI y se le ajustó la densidad óptica a 0,5 en la escala de McFarland, para el control de esterilidad en la columna 1 se colocó 200 µL de RPMI, y en la columna 12 se coloca 100 µL de RPMI con 2% de DMSO y 100 µL del inóculo se utilizó para el control de crecimiento del inóculo.

3.4.2. Fase 2

Se colocó 100 µL del inóculo en la placa de microtitulación de la columna 2 al 10 y se le dejó incubar a 35 °C durante 48 h, para la lectura visual de los resultados se observó la columna que presentara la reducción de $\geq 50\%$ con el crecimiento control de la columna 12 para CMI, para la CMF se determinó por el cultivo de las columnas que ya no presentaron crecimiento.

3.4.3. Fase 3

Se tomó la CMI y CMF, para pesar la cantidad necesaria de comprimidos de ketoconazol, luego se diluyó con la cantidad suficiente de polietilenglicol, posterior a esto se preparó la base gel de Carbopol, se le acondicionó con EDTA como agente antioxidante en cantidad suficiente, finalmente en una probeta de 500 ml se colocó la cantidad necesaria de ketoconazol diluido y se le adicionó lentamente la base de gel hasta llegar a los 250 mL, finalmente se embaza en frascos de plásticos de color ámbar especiales para dispensar.

3.4.4. Fase 4

Se analizó el control de calidad, para ello se realizó las pruebas de organolépticas, las características fisicoquímicas y microbiológicas de la formulación.

3.5. Técnicas y métodos

3.5.1. Preparación del medio de cultivo

Se tomó la formulación determinada por el documento M27-A3 del CLSI para la preparación del medio de cultivo donde se toma en cuenta los siguientes ingredientes:

- RPM1 1640 con glutamina y sin bicarbonato de sodio.
- Ácido Morfolino propano sulfónico (MOPS).
- Agua Destilada (CLSI, 2007).

Primero con los materiales limpios y secos que colocó 60 mL de agua destilada en una probeta de 100 mL, añadiendo 1.04 g de RPM1 1640 con 3.43 g de MOPS, se agito con una varilla de agitación hasta que se disolvió por completo y con la ayuda de una piceta se retiró las partículas que se quedaron en las paredes de la probeta hasta completar los 90 mL; se ajustó el pH con una solución de NaOH 5N, sugerido por la técnica del CLSI, hasta llevar a un pH de 7 ± 0.1 , después se completó el volumen hasta llegar a los 100 mL.

Para la esterilización del medio, se siguió la técnica para líquidos termosensibles, que indica que se debe hacer una esterilización por filtrado, se tomó el medio preparado y se colocó en un embudo Buhner con un filtro de membrana de $0.22 \mu\text{m}$ de diámetro de poro, que se armó con un Kitasato de 250 mL y una bomba de succión, posterior a la esterilización se almacenó el medio de cultivo en un frasco estéril hasta su uso (Sánchez et al., 2017).

3.5.2. Preparación de la solución madre de ketoconazol

La solución madre debe tener una concentración de 1.6 mg/ml de ketoconazol, como estipula la técnica de CLSI, para esto se partió de un comprimido de 200mg de ketoconazol, tomando el peso promedio de 5 comprimidos que es de 302 mg, se trituro finamente y se diluyó a 2 ml en DMSO, con una pipeta graduada de 5ml se tomó el disolvente y se colocó en una probeta de 5 ml, añadiendo 4.83 mg de Pa, dando la concentración deseada de Pa.

$$Xmg P. a. = \frac{2 mL \times 1.6 mg Pa \times 302 mg med}{1mL \times 200 mg de Pa} = 4.832 mg Pa$$

Ilustración 3-1: Cálculo para la preparación de la solución madre

Realizado por: Peñaherrera I., 2023

3.5.3. *Disoluciones de la solución madre de ketoconazol*

Para esto se necesitó 12 tubos de ensayo etiquetados numéricamente, se comenzó colocando 1.3 ml de la solución madre en el tubo #2, de esta se pasó 0.5ml al tubo #3, 0.25 al tubo #4 y #5, el tubo #3 y #4 se completaron hasta llegar a 1 ml y al tubo #5 hasta llegar a 2 ml; continuando se tomó 0.5, 0.25 y 0.25 ml del tubo #5 para pasarlos a los tubos #6, #7 y #8 respectivamente, a su vez se completó con 0.5, 0.75 y 1.75ml de DMSO, después se repite el proceso con los tubos #9, #10 y #11, el tubo #1 se utilizó como control de esterilidad para lo que se añadió 5 mL de RPMI, al tubo # 12 se lo tomó como control de crecimiento, colocando 4.9 ml de RPMI con 5 ml de DMSO, posterior a esto se pasó 0.1ml del #2 al #11 a otros con la misma numeración, finalmente a estos se les añadió 4.9ml de RPMI siendo una dilución 1:50, se tuvo al final 12 tubos de ensayo con 5 ml cada uno, siendo las concentraciones el doble de lo que se necesitó (CLSI, 2007).

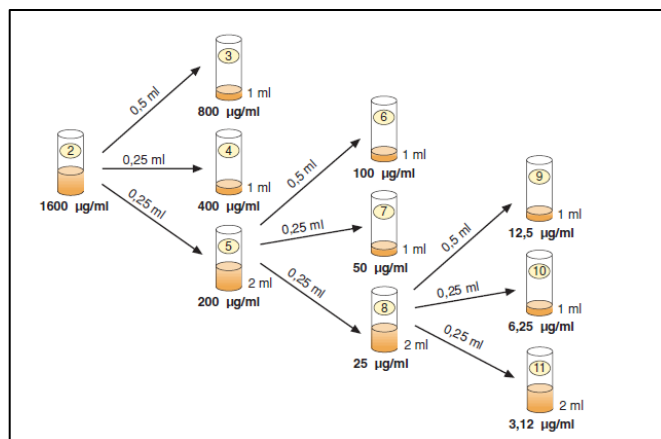


Ilustración 3-2: Representación de la dilución

Fuente: CLSI, 2007

Por último, se tomó 100 µL de cada tubo con una pipeta automática de 100 µL y se colocó en la placa de micro titulación en su respectiva columna, llenándose a la par cada fila (A-H), una vez lleno se le tapó y se envolvió en plástico film para evitar su evaporación, se mantuvo en congelación, hasta que se utilizó para la inoculación.

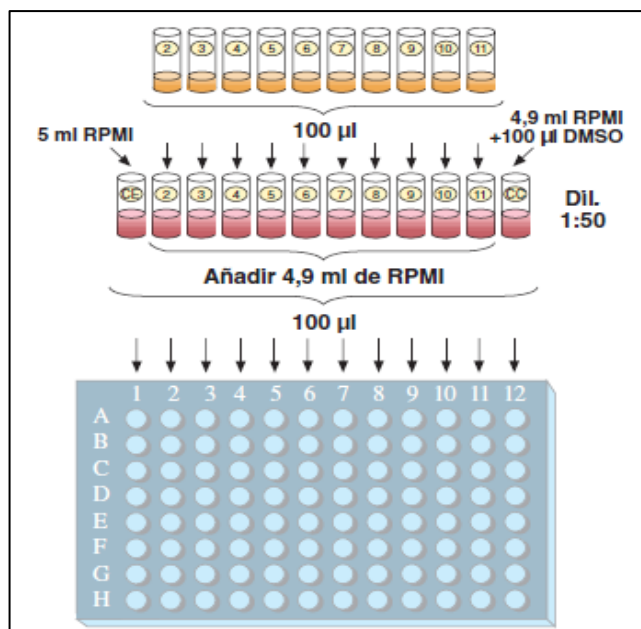


Ilustración 3-3: Dilución 1/50 y llenado de placa

Fuente: CLSI, 2007

3.5.4. Preparación de Inóculo

Se preparó tocando con el asa de cultivo 5 colonias ≥ 1 mm y de 24 h de crecimiento en placa de SDA que se resuspenden en un tubo con 5 ml solución salina (NaCl 0,85%), esta solución salina se preparó tomando una solución salina al 0.9% de 100 ml para suero, se calculó que volumen se debe de llevar para obtener la concentración de 0.85%, dio como resultado 105.88ml, por lo tanto el volumen que se añadió fue de 5.88ml, esto se hizo tomando agua destilada estéril con una jeringuilla estéril descartable de 10 ml en una cámara de flujo laminar y se introduce en la solución salina (CLSI, 2007).

$$XmL = \frac{0.9\% \times 100ml}{0.85\%} = 105.88mL$$

$$\Delta V = 105.88ml - 100ml = 5.88mL$$

Ilustración 3-4: Calculo para preparar NaCl 0.85%

Realizado por: Peñaherrera I., 2023

Una vez se agitó bien con ayuda de un espectrofotómetro a una longitud de onda de 530 nm, se ajusta a una densidad óptica 0,5 McFarland, esto se logra preparando una solución de sulfato de bario, se preparó se tomó 24,875 ml Ácido Sulfúrico al 1% en un vaso de precipitación de 50 ml con 0.125 ml de Cloruro de Bario al 1.175%, se midió la absorbancia de la disolución y se

comparó con la absorbancia de la suspensión del inóculo, se tuvo que ajustar la suspensión salina añadiendo 0.35ml de cloruro de sodio 0.85% (CLSI, 2007; Sánchez et al., 2017).

Esta solución tuvo una concentración final aproximada de $1 \times 10^6 - 5 \times 10^6$ UFC/ml. Posteriormente se realizó una dilución 1:1000 con medio RPMI dando una concentración de (concentración de $1 \times 10^3 - 5 \times 10^3$ UFC/mL). Esta última dilución es la que se utilizó para inocular las placas de antifúngico.

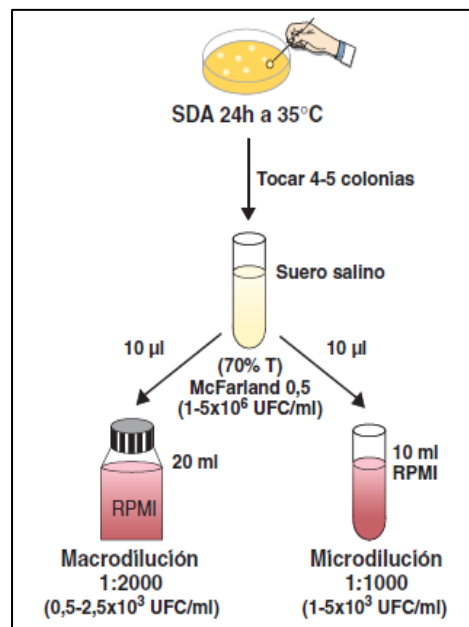


Ilustración 3-5: Esquema de preparación del inóculo.

Fuente: CLSI, 2007

3.5.5. Inoculación y lectura de resultados

Para la inoculación se sacó las placas del congelador y se dejaron a temperatura ambiente hasta su completa descongelación. Se inocularon con 100 µl de la suspensión de levadura tomada con una pipeta automática, se inoculó desde el pocillo 2 hasta el 12 dando una concentración final de levaduras en las placas será de $0,5 \times 10^3 - 2,5 \times 10^3$. La columna #1 que contiene 200 µl de RPMI, se utiliza para el control de esterilidad del medio, la columna nº 12 no contiene antifúngico, pero debe tener la misma concentración de disolvente que los pocillos con antifúngico. Es el control de crecimiento. Las placas se incuban a 35 °C. Las inoculadas con especies del género *Candida* durante 48 h (CLSI, 2007).

La lectura de la CMI se realizó frente a un fondo negro, se identificó la CMI con la concentración más baja de antifúngico que produce una reducción aparente del crecimiento de la levadura

(<50%), se comparó con el crecimiento control después de 48 h de incubación, la concentración mínima fungicida se identificó con la concentración de antifúngico que presentó nulo crecimiento de levadura.

Para la lectura de la CMF se tomó en cuenta los pocillos que no presentan turbidez, sembrando en placas Petri con Potato Dextrosa Agar, tomando la muestra de tres filas diferentes elegidas al azar, incubando por 48 h, a 35 °C, se determinó la CMF a partir del cultivo que no presente crecimiento en placa (CLSI, 2007).

3.5.6. Preparación del Gel

Para la preparación el gel antifúngico, se verifica que los enseres y materiales necesarios estén limpios. A continuación, se identifica, se pesa y se rotula los excipientes. Continuamente se disuelve 3 gramos de Carbopol 940 en 500 mL de agua destilada con agitación constante. Posterior a esto se añade los mL de EDTA necesario, necesarios para la formulación, se mezcla con una varilla de agitación y se agrega el ketoconazol disuelto en propilenglicol en las cantidades que se calculó a partir de la CMI y CMF (Montes, 2018; Vera et al., 2018).

3.5.7. Pruebas de Calidad

3.5.7.1. Parámetros organolépticos de la formulación

De acuerdo con el trabajo realizado por Montes (2018), las características como el olor, Estas características proporcionan al producto cualidades para la aceptación del consumidor, para la formulación se evaluaron los siguientes aspectos considerado un producto óptimo:

- Determinación organoléptica

Se colocó una pequeña cantidad sobre el reverso de la mano, se determinaron el olor y color. Para la consistencia se colocó 10 g de gel en una baso de precipitación, observando su fluides, tomando en cuenta tres criterios: fluida, medianamente fluida y poco fluida.

3.5.7.2. Control de los parámetros físicos y químicos

Los parámetros analizados son los establecidos por la USP-38, para ello se diluyo el gel preparado en agua destilada de acuerdo con los siguientes parámetros según la técnica (Montes, 2018).

Para la extensibilidad se efectuó colocando una hoja de papel milimetrado, encima de esta se colocó la tapa de una caja petri, luego se colocó 0,2 g de emulsión y finalmente se colocó la base de la caja, se aplicó peso durante un minuto y se observó el diámetro formado.

En el análisis de pH se colocó en un vaso de precipitación con 30 mL de agua destilada, luego 2 g de gel, se agito hasta homogenizar y se midió el pH.

La densidad fue medida a través de un picnómetro, primero midiéndolo vacío, luego con agua y finalmente con el gel, se realizó el cálculo correspondiente y se determinó la densidad de la crema.

3.5.7.3. Análisis microbiológico

Se realizó el recuento microbiano con el uso de placas petrifilm, tomando en cuenta a los microorganismos establecidos por la USP-38 para control microbiológico para formas farmacéuticas no estériles: *Staphylococcus aureus*, *Pseudomona auroginosa*, aerobios, mohos y levaduras.

- Preparación de la muestra

Para la preparación de la muestra a ser procesada se realizó el siguiente procedimiento:

- Se utilizó el método para formas farmacéuticas cutáneas descritas por (STANPA, 2021), entonces se hizo una dilución 1:100 en agua de peptona previamente esterilizada, como lo estipula la norma ISO 4833-1.

- Inoculación de las placas petrifilm

- Se colocó la placa Petrifilm en una superficie plana.
- Se levantó el plástico superior, con la pipeta perpendicular se colocó 1 mL de suspensión de muestra en el centro de la lámina de petrifilm.
- Se bajó el plástico superior, despacio sin dejar que se formen burbujas.
- Se colocó el esparcidor con el lado plano contra la placa petrifilm, presionando con suavidad para distribuir la muestra uniformemente y distribuir el inóculo sobre toda la placa petrifilm, antes de que se gelifique.
- Se retiró el espaciador de la placa y se dejó reposar la placa, para que se forme el gel (PetrifilmTM, 2015b, 2015a, 2017a, 2017b).

- Inoculación en MacConkey II agar / Agar sangre para *Pseudomona*
- Se colocó la caja petri en una superficie plana.
- Se retiró la tapa y con la pipeta perpendicular se colocó 1 mL de suspensión de muestra en el centro del agar dispersándolo con un asa de digralsky.
- Incubación e interpretación

Se puso a incubar las Petrifilm se colocaron en posición horizontal con el lado transparente hacia arriba en pila bajo las siguientes condiciones descritas en la tabla 3-4, donde se describe las condiciones para cada microorganismo analizado, además en la tabla 3-5 se toma en cuenta los aspectos para la interpretación del crecimiento en placas.

Tabla 3-4: Criterios de Incubación para cada microorganismo

Microorganismo	Incubación
<i>Staphylococcus aureus</i>	Tiempo de 24 h \pm 2 h a 35 °C \pm 1 °C
Aerobios	Tiempo de 48 h \pm 3 h a 35 °C \pm 1 °C
<i>Pseudomona auroginosa</i>	Tiempo de 24 h \pm 2 h a 35 °C \pm 1 °C
Mohos y levaduras	Temperatura de 25°C \pm 1°C por 5 días

Fuente:(PetrifilmTM, 2015b, 2015a, 2017a, 2017b).

Realizado por: Peñaherrera I., 2023

Tabla 3-5: Interpretación de las placas

Características de crecimiento	
<i>Staphylococcus aureus</i>	Colonias rojo-violeta
Aerobios	Colonias pequeñas rojizas
<i>Pseudomona auroginosa</i>	Colonias irregulares, de incoloras a color rosa
Mohos	Colonias grandes / Bordes difusos / Color variable
Levaduras	Colonias de bordes definidos y pequeños de color rosa-tostado a azul-verdoso con relieve

Fuente: (PetrifilmTM, 2015b, 2015a, 2017a, 2017b)

Realizado por: Peñaherrera I., 2023

- Identificación de *Pseudomona auroginosa*
- Se toma una muestra de las colonias crecidas en agar McConkey y agar sangre con un asa.

- Se inocula en una caja petri con CHROMagar Pseudomonas .
- Se incuba a 35°C por 24 h.
- Si la colonia crecida es de color azul verdosa, da positivo para *Pseudomonas auroginosa*.

CAPÍTULO IV

4. ANALISIS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

4.1. Concentración mínima inhibitoria y fungicida

4.1.1. *Estándar McFarland*

Para la determinación de la concentración mínima inhibitoria primero, se tomó en cuenta todos los requisitos que necesitábamos para la realización de la técnica, es así como se partió por la obtención de una solución estándar 0,5 McFarland, que se realizó con una solución de 24,875 ml Ácido Sulfúrico al 1% en un vaso de precipitación de 50 ml con 0.125 ml de Cloruro de Bario al 1.175%, se preparó a partir de reactivos suministrados por el laboratorio de Bromatología de la ESPOCH (Ácido Sulfúrico 37 % , densidad 1,19 g/mL y Cloruro de Bario di Hidratado al 99,99%), dando una absorbancia de 0.113 a 530 nm, indicado en la Ilustración 4-1, concordando con lo obtenido por Flores (2022), que la absorbancia de 0,5 McFarland debe da una absorbancia entre 0,8 a 1,13.

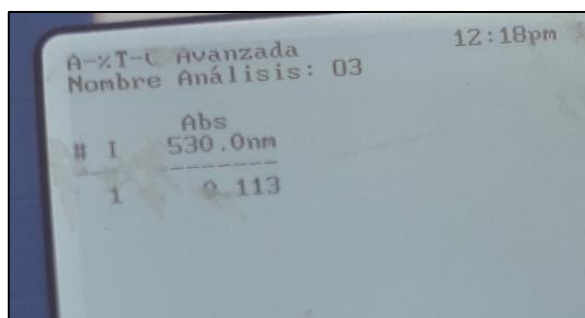


Ilustración 4-1: Densidad Óptica

Realizado por: Iván Peñaherrera

4.1.2. *Preparación del medio de cultivo*

Se siguió todos los pasos de preparación de 100 mL medio de cultivo, usando las especificaciones que indica el CLSI, partiendo de 90 ml de agua destilada, añadiendo las cantidades de RPMI 1640 y MOPS descritos en el marco metodológico, antes de completar los 100 mL con agua destilada se ajustó el pH del medio de cultivo, se hizo una medición inicial que dio 6.2, siguiendo una técnica de goteo con una solución de NaCl 5 N, se ajustó el pH hasta llegar a 7.01, descrito en la Ilustración 4-2, siguiendo los parámetros para la preparación como lo indica el CLSI, ya con el pH optimo se completó el volumen hasta completar los 100 mL.

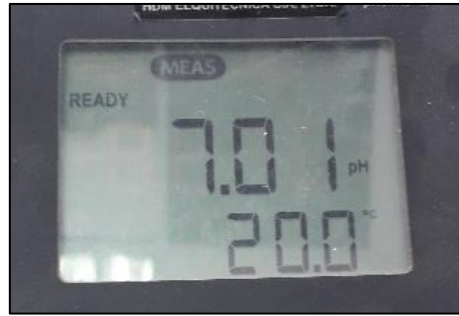


Ilustración 4-2: pH del medio de cultivo

Realizado por: Peñaherrera Iván, 2022

Finalmente se consideró realizar una doble filtración para el medio de cultivo, como lo sugiere Puebla et al. (2012), que menciona que es necesario una doble filtración para asegurar la esterilidad del medio, y finalmente en un frasco estéril se almacena el medio de cultivo en una refrigeradora hasta su uso.

4.1.3. *Concentración de ketoconazol en las placas de microtitulación*

Se obtuvieron 10 concentraciones diferentes a analizar, se partió de una solución con una concentración 100 veces mayor a la más alta a ensayar, como lo indica el CLSI (2007), la CMI de la *Candida albicans* se encuentra entre 0.2 y 2 µg/ml, y por lo que se tomó como concentración más alta 16 µg/ml, logrando abarcar también la CMF; se siguió la técnica de microdilución a partir de la solución madre dos diluciones, la primera 1:50 y después una 1:2 como se describió en el marco metodológico, obteniendo así concentración de 16 µg/ml a 0.03 µg/ml descritos en la Tabla 4-1 (CLSI, 2007; Sánchez et al., 2017).

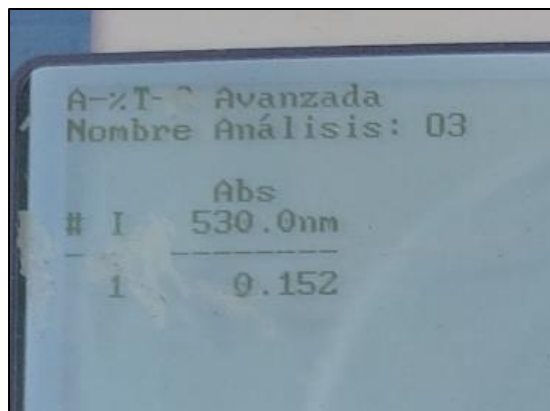
Tabla 4-1: Concentraciones inicial en µg/mL

Tubo	A partir de la solución madre	Dilución 1:50	Dilución 1:2 en placa
1	-	-	Control de esterilidad
2	1600	32	16
3	800	16	8
4	400	8	4
5	200	4	2
6	100	2	1
7	50	1	0.5
8	25	0.5	0.25
9	12.5	0.25	0.12
10	6.25	0.12	0.06
11	3.12	0.06	0.03
12	-	-	Control de Crecimiento

Realizado por: Peñaherrera Iván, 2022

4.1.4. Preparación del Inóculo

Se utilizó una cepa de *Candida albicans* de laboratorio, previamente identificada y certificada por el Centro de Investigación Microbiológica (CIMIC), laboratorio de mediana complejidad, dirigida por la Dra. Andrea Chavez Msc. Microbiología. A la sepa se le realizó una nueva siembra para terminar con el tiempo de crecimiento de 24 h que solicita el CLSI, siguiendo el procedimiento descrito en el marco metodológico se suspendió las colonias en NaCl al 0.85%, para la estandarización a 0.5 McFarland, dando una absorbancia de 0.152 como se muestra en la Ilustración 3-4, siendo necesario el ajuste de la densidad óptica a 0.113 obtenido del estándar preparado, aumentando 2.42 mL de solución salina, con calculada en la Ilustración 4-4, así logrando una concentración de $1-5 \times 10^6$ UFC/mL, finalmente siguiendo lo indicado por la técnica del CLSI se realizó la dilución 1:1000, obteniendo $1-5 \times 10^3$ UFC/mL, que según CLSI (2007), Jaramillo, 2018 y Sánchez et al., 2017, es la concentración adecuada para realizar la técnica de microdilución.



A-T-C Avanzada	
Nombre Análisis: 03	
Abs	
#	I
1	0.152

Ilustración 3-4: Absorbancia del medio de cultivo

Realizado por: Peñaherrera I., 2023

$$XmL \text{ NaCl } 0.85\% = \frac{0.152 \times 7 \text{ mL}}{0.113} - 7mL = 2,42mL$$

Ilustración 4-4: Calculo del volumen a añadir de NaCl

Realizado por: Peñaherrera I., 2023

4.1.5. Lectura e interpretación de la CMI

Se llenaron las placas como se indica en la técnica de microdilución del CLSI, colocando las concentraciones descritas en la Tabla 1:4, en cada fila de la A hasta la H, repitiendo así el ensayo un total de 8 veces, se continuó incubando a 35 °C y se leyó los resultados a las 48 h.

Siguiendo las indicaciones del CLSI para la lectura visual, se observaron en primera estancia la columna 1 (control de esterilidad) y 12 (control de crecimiento), se mantuvo la esterilidad, gracias a que no hubo crecimiento en la columna número 1 de ninguna de las filas, y basándose en el aspecto del control de crecimiento que se muestra en la Ilustración 5-4, se determinó que la reducción del 50% del crecimiento que corresponde a la CMI, se encuentra en la columna 6, excepto en las filas E y H, que se encontraba en el 6, concluyendo que la CMI se encuentra en 1 µg/mL, igual a lo encontrado por Guillén (2020) y Negrete (2018), que determinaron las CMI del ketoconazol en el mismo rango, además entra dentro del rango del estándar descrito por el CLSI frente a una cepa de *Candida krusei* ATCC 6258, que lo declara de 0.12 a 1 µg/mL, (Joya et al., 2017; Scalvenci & Yaguache, 2016).

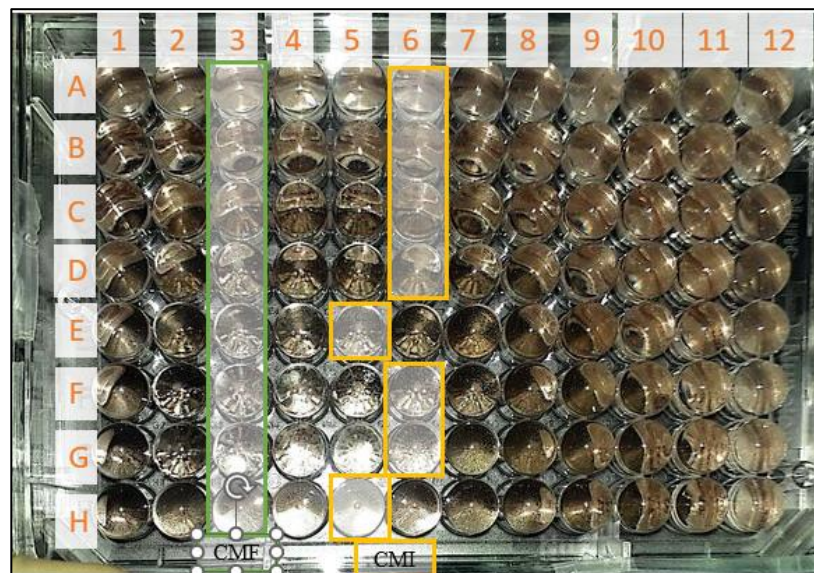


Ilustración 5-4: Placa de microtitulación, con la CMI y CMF

Realizado por: Peñaherrera I., 2023

4.1.6. Determinación de la CMF

Una vez determinada la CMI, se continuó la inspección en la placa donde se observó que el descenso total del crecimiento de la levadura a partir de la columna 4 a la 2, por lo que siguiendo la técnica de Castro et al. (2019), se hizo un cultivo en PDA de la columna 2, 3 y 4, eligiendo de manera aleatoria tres filas (B, F y H), para cada pocillo se realizó un cultivo, una vez terminado

el tiempo de 48 h, este método es designado porque las sepas de *Candida albicans* presenta una cola de crecimiento (trailing growth) aún en concentraciones altas de antifúngico; se hizo la lectura de los cultivos, presentando poco crecimiento en la columna 4, en las columna 2 y 3 no hubo crecimiento fúngico en las tres filas, visto en la Ilustración 6-4, por lo que se estableció que la concentración mínima fungicida esta entre 8 y 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$, se obtuvo una concentración igual a la obtenida por Zambrano, 2018, en su trabajo.

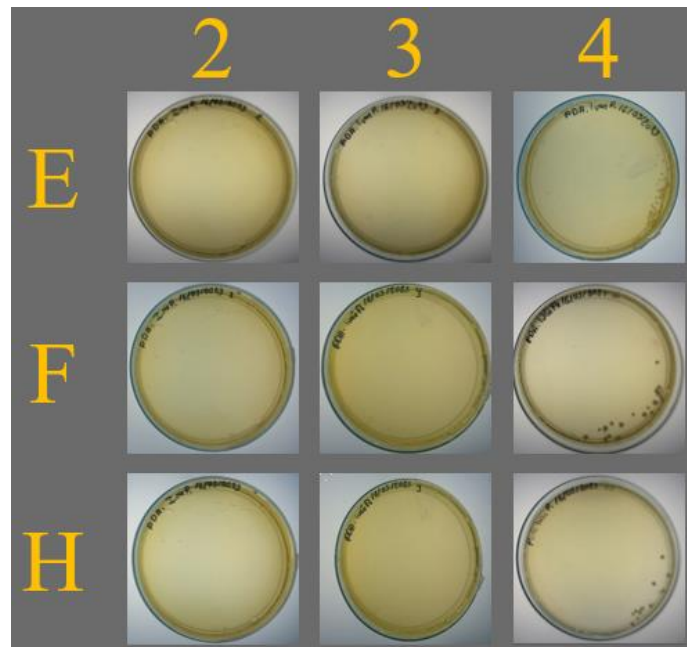


Ilustración 6-4: Determinación de la CMF

Realizado por: Peñaherrera I., 2023

4.2. Interpretación de la CMI y CMF

Los resultados obtenidos de CMI (1-2 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y CMF (4-8 $\mu\text{g}/\text{mL}$), se tomaron en cuenta para determinar la sensibilidad del ketoconazol frente a *C. albicans*, que es reconocida por su efecto de trailing growth como menciona Negrete et al. (2018) y UBE (2020) tiende a dar crecimiento en concentraciones altas de antifúngico mayores a la CMI, teniendo en cuenta también que los azoles en su mayoría son dosis dependiente para su acción fungicida, como se comprobó al obtener la CMF.

Se buscó determinar la sensibilidad del ketoconazol, al no tener en la actualidad puntos de corte declarados por el CLSI para este antifúngico, se utilizaron los parámetros establecidos por método de análisis FUNGITEST 60780, técnica usada ampliamente en estudios de sensibilidad frente a varias sepas de hongos como en el trabajo de (Negrete et al., 2018; Puebla et al., 2012), donde declara como sensibles a cepas que sean inhibidas por una concentración $\leq 0.5 \mu\text{g}/\text{mL}$ y resistente

$\geq 4 \mu\text{g/mL}$, finalmente concluyendo que la CMI del ketoconazol frente a *C. albicans* para este trabajo es medianamente sensible, teniendo un resultado igual a Guillén (2020) que examinó 144 especies de *Candidas* frente a diferentes azoles, entre ellos el ketoconazol, es sensible en un 72% de las especies estudiadas.

4.2.1. *Formulación del gel de Ketoconazol*

Una vez determinado que el ketoconazol es sensible frente a *C. albicans*, se continúa con la formulación utilizando los criterios que establece el manual de Formulación Magistral Oftálmica Antiinfecciosa, que establece que para las formulaciones tópicas se considera la concentración de antibióticos o antifúngicos debe ser mucho mayor a la CMI o CMF, dado que estas concentraciones son el estimado que se espera a nivel sérico mencionado por Velasteguí, 2022 y Villacís & Ávila, 2020, a su vez el manual específica que para debe considerarse que el tiempo que debe permanecer en la piel el medicamento debe ser alto así como su concentración para que se mantenga y siguiendo lo considerado por Fernández et al., 2019 y Vera et al., 2018, se determinó que la concentración más adecuada de ketoconazol es al 2%, logrando ser capaz de mantenerse en la piel por un buen periodo de tiempo hasta su próxima aplicación y cumpliendo con el éxito terapéutico.

A su vez se consideró el uso de EDTA como agente antioxidante y conservante, además de propilenglicol como cosolvente para el Ketoconazol gracias a su propiedad como cosolvente, quedando la formulación como se indica en la Tabla 4-2, calculado para la formulación de 100 g de gel.

Tabla 4-2: Formulación

Ingrediente	Cantidad recomendada	Cantidad usada
Ketoconazol	2%	2 g
EDTA	0.005 - 1%	0.1 g
Propilenglicol	5 - 80%	5 g
Base de Gel Carbopol	1 - 2%	c.s.p. 100 g

Fuente: (Acofarma 2019a; 2019b, 2021)

Realizado por: Peñaherrera I., 2023

4.3. Control de Calidad

4.3.1. Pruebas organolépticas

Para el análisis de estas características, se tomaron en cuenta los aspectos mencionados en el marco metodológico, para lo cual se hizo la examinación al tacto dando los resultados obtenidos en la Tabla 4-3, estos son semejantes a los obtenidos en el trabajo de Montes, 2018, que presento el análisis de las siguientes características: color blanquecino, sin grumos y además de un olor neutro.

Tabla 4-3: Características Organolépticas

Característica	Resultado
Olor	Neutro
Color	Blanquecino
Consistencia	Media
Grumos	Sin grumos

Realizado por: Peñaherrera I., 2023.

4.3.2. Pruebas fisicoquímicas

Para asegurar la exactitud de los resultados se realizó por triplicado cada uno de los ensayos, siguiendo los parámetros establecidos en el marco metodológico, detallados en la Tabla 4-3.

Tabla 4-4: Parámetros fisicoquímicos

Parámetro	Valores	Promedio
pH	5.69	5.7
	5.71	
	5.69	
Densidad	0.966 g/mL	0.966 g/mL
	0.964 g/mL	
	0.968 g/mL	
Extensibilidad	7 cm	7.33 cm
	7.4 cm	
	7.6 cm	

Realizado por: Peñaherrera I., 2023

Para lograra determinar la extensibilidad del gel, se tomó en consideración el señalamiento del margen que deja el diámetro formado por el gel en las cajas Petri, a la vez que se midió con la ayuda de una hoja milimétrica, como se muestra en la Ilustración 7-4, el valor promedio obtenido

fue de 7.33 cm, un valor igual al obtenido por Montes, 2018, y tomando en cuenta que la extensibilidad de los geles es muy buena, comprobado por el resultado obtenido.

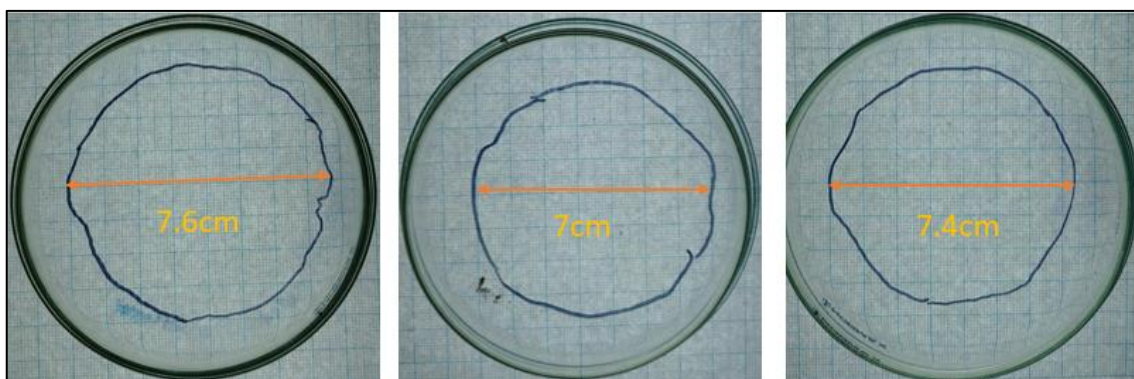


Ilustración 4-7: Determinación de la extensibilidad

Realizado por: Peñaherrera I., 2023

Al analizar el pH, siguiendo los procedimientos estándares, se obtuvo en promedio 5.7, se detallado en la tabla 3-4, este pH ácido está de acuerdo con los valores que debe tener una formulación no estéril, entre 4.5 y 6.5, declarado también por la USP 38 y CCECM, (2006) en su trabajo que realizo el control de calidad de distintos geles, dando un promedio general de 5.5.

El parámetro físico analizado fue la densidad, el cual se siguió todos los aspectos para el cálculo, pesando el picnómetro vacío, con agua destilada y finalmente con el gel y se procuró no de dejar burbujas, como lo indica la norma ISO 22716 (2018), se puede observar las mediciones en la Ilustración 4-8, la densidad promedio que se calculó fue de 0.966 mg/mL, similar a lo reportado por Montes, 2018, en su trabajo experimental, y estando dentro de los valores comunes para un gel base de carbopol.

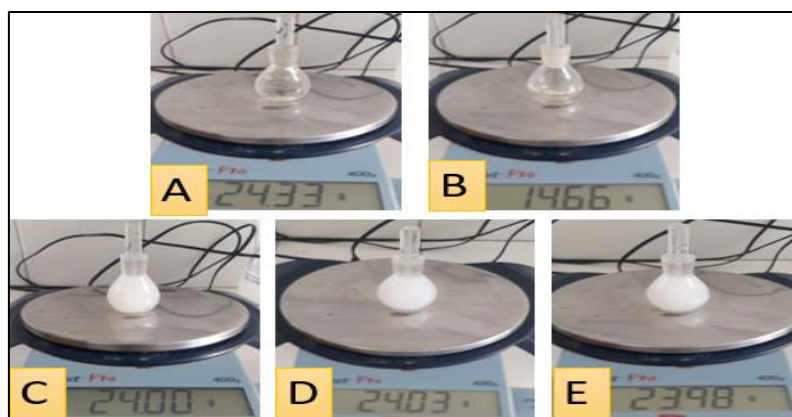


Ilustración 4-8: Determinación de la densidad; A) peso del picnómetro vacío, B) picnómetro con agua, C, D y E) picnómetro con gel

Realizado por: Peñaherrera I., 2023

4.3.3. Pruebas microbiológicas

La técnica utilizada para la esta determinación es el recuento en placas petrifilm, se realizó el procedimiento de siembra tomando en cuenta el conservante elegido que es EDTA, como menciona Di. Medina, 2018, se debe realizar una dilución 1:50 en agua de peptona, para inhibir la acción antibiótica del conservante, y lograr recuperar toda la carga microbiana intacta de la forma farmacéutica, tienen los resultados presentes en la Tabla 4-4 y en la ilustración 9-4.

Tabla 4-4: Recuento microbiano

Microrganismo	Recuento
<i>Pseudomona auroginosa</i>	Ausencia
<i>Staphylococcus aureus</i>	Ausencia
Aerobios mesófilos	Ausencia
Hongos y levaduras	Ausencia

Realizado por: Peñaherrera I., 2023

Los resultados obtenidos para este análisis es la ausencia para cada microorganismo analizado, estando dentro de los parámetros aceptados por la USP 38, que menciona en su apartado de criterios de aceptación para formas farmacéuticas no estériles de uso cutáneo debe tener 10^2 UFC/g de aerobios mesófilos, 10^1 UFC/g de hongos y levaduras, ausencia de *Staphylococcus aureus* y *Pseudomona auroginosa*, a la vez cumpliendo con las normas, (ISO 18415, 2017; ISO 21148, 2017; ISO 22718, 2015).

CONCLUSIONES

- Con la determinación de la CMI y CMF para el ketoconazol, se concluye que *Candida albicans* es mediamente sensible frente al antifúngico, haciendo factible que continúe realizando formulaciones magistrales a base de este antimicótico, tomando en cuenta que para administraciones tópicas su interpretación es cualitativa.
- Fue viable la elaboración del gel de ketoconazol con la CMI y CMF, la baja complejidad que tiene este semisólido cutáneo, favorece a su reproducibilidad en centros de salud que cuenten con área de farmacotécnica, brindando un tratamiento eficaz.
- La formulación tópica de ketoconazol cumple con todos los parámetros de calidad analizados, por lo que es una buena opción para la administración en pacientes, al brindar seguridad y eficacia en su uso.

RECOMENDACIONES

- Para trabajos siguientes, se recomienda tomar en cuenta el tiempo que se demora en conseguir todos los insumos para la técnica ya que puede ser una limitante.
- Al realizar las microdiluciones, es necesario tener bien etiquetado cada tubo para evitar confusiones al momento de pipetear.
- Mantener la esterilidad en la cámara de flujo laminar para evitar la contaminación en la placa de microtitulación.
- Al realizar la trituración de los comprimidos se sugiere dejar al polvo lo más fino posible, para favorecer la dilución.

BIBLIOGRAFÍA

ACOFARMA. EDTA SAL DISODICA [en línea] 2019. Disponible en: <https://formulasmagistrales.acofarma.com/idb/descarga/3/f06a75fe6522d7a9.pdf>

ACOFARMA. Propilenglicol [en línea] 2019. Disponible en: <https://formulasmagistrales.acofarma.com/idb/descarga/3/f5057ffd6e4c6c4e.pdf#:~:text=Se%20considera%20una%20base%20hidrosoluble%20que%20tiene%20una,los%20proncipios%20acti vos%2C%20aunque%20puede%20ser%20demasiado%20irritante.>

ACOFARMA. Formulaciones en Gel [en línea] 2011. Recuperado a partir de : <https://formacion.acofarma.com/wp-content/uploads/2023/04/PRESENTACION-FORMULACION-GELES.pdf>

Alonso, J. Clasificación y Descripción de los hongos [en línea] 2018. Disponible en: http://www.smlucus.org/UserFiles/Files/cursos/3TAXONOMIA_Y_CLASIFICACION_DE_LOS_HONGOS.pdf

Barrachida, J. Pasado, Presente y Futuro de la Formulación Magistral [en línea] 2019. Disponible en: <https://www.afcv.es/public/Attachment/2020/1/21-10-19DiscursoJ.FernandoBarrachinaweb.pdf>

Bertolini, V et al. Abundancia y riqueza de hongos micorrizógenos arbusculares en cafetales de Soconusco, Chiapas, México [en línea] 2018. Disponible en: https://www.scielo.sa.cr/scielo.php?pid=S0034-77442018000100091&script=sci_arttext

Carlucci, A. Farmacotecnia II [en línea] 2017. Disponible en: <https://trovare.hospitalitaliano.org.ar/greenstone/collect/planes/index/assoc/D847.dir/programa-farmacotecnia-ii-2017.pdf>

Castro, C et al. Actualización de los métodos de estudio de sensibilidad in vitro a los antifúngicos. Elsevier [en línea] 2019. Disponible en: <https://www.elsevier.es/es-revista-enfermedades-infecciosas-microbiologia-clinica-28-articulo-actualizacion-metodos-estudio-sensibilidad-in-S0213005X19301806>

CCECM. Buenas prácticas de Fabricación de Líquidos y Semisólidos [en línea] 2006. Disponible en: https://www.cecmecmed.cu/sites/default/files/adjuntos/Reglamentacion/reg_16-06_anexo-08_buenas_practicas_de_fabricacion_de_liquidos_y_semisolidos.pdf

CIMA. Ketoconazol Abamed 20 mg/g crema [en línea] 2010. Disponible en: https://cima.aemps.es/cima/pdfs/es/ft/58437/58437_ft.pdf

CLSI. Métodos estandarizados por el CLSI para el estudio de la sensibilidad a los antifúngicos. Revista Iberoamericana de Microbiología, 2007.

de Diego, M., & del Arco, J. Geles [en línea] 2016. Disponible en: <https://botplusweb.farmaceuticos.com/documentos/2016/11/29/104989.pdf>

Drommund, R. Candida albicans [en línea] 2018. Disponible en: <https://www.immunology.org/es/public-information/bitesized-immunology/pathogens-and-disease/candida-albicans>

España, S. SITUACIÓN DE LA MICOSIS SUPERFICIAL EN ECUADOR, 2019.

Fernandez, A et al. Formulación magistral oftálmica antiinfecciosa. Sociedad Española de Farmacia Hospitalaria [en línea] 2019. Disponible en: <https://www.sefh.es/bibliotecavirtual/FormOFta/FormMagisOftalmicaAntiinfecciosa.pdf>

Fikri, N. ¿Qué tipos de formas farmacéuticas existen actualmente? INESEM [en línea] 2023. Disponible en: <https://www.inesem.es/revistadigital/biosanitario/tipos-de-formas-farmacauticas/>

Flores, K. Biosíntesis de nanopartículas de cobre: caracterización, evaluación de biocompatibilidad y propiedades antimicrobianas. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California [en línea] 2022. Disponible en: https://cicese.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/1007/3756/1/tesis_Karla%20Maritza%20Flores%20Rábago_14%20sep%202022.pdf

FUNGITESTTM. Determinación de la Sensibilidad de los Hongos a los Agentes Antifúngicos [en línea] 2010. Disponible en: https://commerce.bi-rad.com/webroot/web/pdf/inserts/CDG/es/60780_881060_ES.pdf

García Salom, P., & Alonso Herreros, J. El real decreto de medicamentos en situaciones especiales y la farmacotecnia hospitalaria. *Farmacia Hospitalaria*, 34(3), 103–105 [en línea] 2010. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.farma.2010.02.001>

Guillén, D. Caracterización del Antifungigrama en Urocultivo y Cultivo de Secreción Vaginal Realizado en el Hospital III 'Daniel Alcides Carrión' -ESSALUD, Tacna- Peru, 2019. Universidad Privada de Tacna [en línea] 2020. Disponible en: <https://repositorio.upt.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12969/1629/Guillen-Castro-Damphier.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

ISO 18415. Cosméticos, Microbiología. Detección de microorganismos específicos y no específicos [en línea] 2017. Disponible en: https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=&cad=rja&uact=8&ved=2ahUKEwj16bj7kO-AAxUjtjEKHSzGBE8QFnoECA8QAQ&url=https%3A%2F%2Fwww.en.aenor.com%2F_layouts%2F15%2Fr.aspx%3Fc%3DN0059052&usg=AOvVaw2eINH21UVqvBDbmj7GaaIY&opi=89978449

ISO 21148. Cosméticos. Microbiología. Instrucciones generales para el examen microbiológico [en línea] 2017. Disponible en: [https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=&cad=rja&uact=8&ved=2ahUKEwityeO5ke-AAxWuRTABHcHcD5cQFnoECCUQAQ&url=https%3A%2F%2Fportal.aenormas.aenor.com%2Frevista%2Fpdf%2Fnov17%2F\(EX\)UNE-EN_ISO_21148%3D2017.pdf&usg=AOvVaw07_f5ZJ5_YbskdCE7Wei1K&opi=89978449](https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=&cad=rja&uact=8&ved=2ahUKEwityeO5ke-AAxWuRTABHcHcD5cQFnoECCUQAQ&url=https%3A%2F%2Fportal.aenormas.aenor.com%2Frevista%2Fpdf%2Fnov17%2F(EX)UNE-EN_ISO_21148%3D2017.pdf&usg=AOvVaw07_f5ZJ5_YbskdCE7Wei1K&opi=89978449)

ISO 22716. Cosméticos. Buenas Prácticas de Manufactura. Directrices sobre Buenas Prácticas de Manufactura [en línea] 2018. Disponible en: https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=&cad=rja&uact=8&ved=2ahUKEwjJ0-PplO-AAxWnmYQIHUxGCrgQFnoECAkQAQ&url=https%3A%2F%2Fwww.intedya.com%2Fproductos%2FPIC_ISO22716_ed03_Rev.pdf&usg=AOvVaw3Wr4EOWoK_U6cidn42iivE&opi=89978449

ISO 22718. Cosméticos. Microbiología Detección de *Staphylococcus aureus* [en línea] 2015. Disponible en: https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=&cad=rja&uact=8&ved=2ahUKEwjJ0-PplO-AAxWnmYQIHUxGCrgQFnoECAkQAQ&url=https%3A%2F%2Fwww.intedya.com%2Fproductos%2FPIC_ISO22718_ed03_Rev.pdf&usg=AOvVaw3Wr4EOWoK_U6cidn42iivE&opi=89978449

d=2ahUKEwio2Y2ole-

AAxVtRTABHbBBBIwQFnoECAsQAQ&url=https%3A%2F%2Fwww.iso.org%2Fstandard%2F68312.html&usg=AOvVaw2GLwIoV6A4bL9ky4t4IGQ-&opi=89978449

Jaramillo, C. Evaluación de la actividad antifúngica del extracto de *Usnea laevis* en hongos fitopatógenos [en línea] 2018. Disponible en: <https://revistas.uv.cl/index.php/Bolmicol/article/view/1091>

Joya, M., Gil, M., & Bastidas, G. Actividad fungistática y fungicida de extractos etanólicos de propóleos sobre el crecimiento in vitro de cepas del género *Candida*. In *Tecnología en Marcha* [en línea] 2017. Disponible en: https://www.scielo.sa.cr/scielo.php?pid=S0379-39822017000300003&script=sci_arttext

Lara, J. Cepas de *Candida albicans*, aisladas en pacientes con diabetes Mellitus y su resistencia a los antifúngicos en el Hospital del día IESS. *Revista Científica Mundo de La Investigación y El Conocimiento*. [en línea] 2019. Disponible en: <file:///C:/Users/LENOVO/Downloads/Dialnet-CepasDeCandidaAlbicansAisladasEnPacientesConDiabet-6796759.pdf>

Lopez, B., Ortonobes, S., & García, C. Ungüentos, pomadas, cremas, geles y pastas: ¿es todo lo mismo? *Formación Activa En Pediatría de Atención Primaria* [en línea] 2018. Disponible en: https://fapap.es/files/639-1294-RUTA/FAPAP_4_2015_Unguentos_pomadas.pdf

Martha, A. Infecciones Fúngicas Oportunistas en Pacientes del Hospital Carlos Andrade Marín en el Periodo 2015-2017 [en línea] 2018. Disponible en: <http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/15901/1/T-UCE-0006-CME-014.pdf>

Martinez, R et al. Hongos y Levaduras: Frábricas de Lipasas. *Redalyc* [en línea] 2019. Disponible en: <https://www.redalyc.org/journal/339/33960285002/33960285002.pdf>

Medina, D. Dermatitis seborreica: una revisión. *Hospital General Regional* [en línea] 2016. Disponible en: <https://www.medigraphic.com/pdfs/cosmetica/dcm-2014/dcm1421.pdf>

Medina, D. Validación Preliminar para la detección de *Escherichia coli* *Candida albicans* y *Aspergillus brasiliensis* en el Producto Farmacéutico ENZIMED. Universidad de Pamplona [en línea] 2018. Disponible en: http://repositoriodspace.unipamplona.edu.co/jspui/bitstream/20.500.12744/2423/1/Medina_Cabarcas_2018_TG.pdf

Montes, J. Propiedades fisicoquímicas de nanosistemas estabilizados con caseinato de sodio: emulsiones, geles y películas. Universidad de Buenos Aires [en línea] 2018. Disponible en: https://bibliotecadigital.exactas.uba.ar/download/tesis/tesis_n6411_MontesDeOcaAvalos.pdf

Musto, A et al. Manual Microbiología y Parasitología [en línea] 2013. Disponible en: <https://www.unaj.edu.ar/wp-content/uploads/2018/06/Manual-de-Microbiologia-y-Parasitologia-2013.pdf>

Negrete, E at al. Susceptibilidad in vitro de diferentes especies de Candida a algunos antifúngicos. Facultad de Ciencias Químicas UASLP, México [en línea] 2018. Disponible en: <http://ninive.uaslp.mx/xmlui/bitstream/handle/i/4314/Poster%20Susceptibilidad%20Candida%2023-26%2c%20mayo%202018.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

Pabón, Y., González, J., & Luz, K. Formas farmacéuticas [en línea] 2017. Disponible en: <https://doi.org/10.16925/greylit.2110>.

Peñaherrera, J. Elaboración de fórmulas magistrales y dosificaciones optimizan recursos en el Hospital Calderón [en línea] 2019. Disponible en: <https://www.edicionmedica.ec/secciones/salud-publica/elaboracion-de-formulas-magistrales-y-dosificaciones-optimizan-recursos-en-el-hospital-calderon-94561>

Perez, N et al. New Formulations Loading Caspofungin for Topical Therapy of Vulvovaginal Candidiasis. MDPI [en línea] 2021. Disponible en: <https://www.mdpi.com/2310-2861/7/4/259>

Petrifilm™, 3M. Placa para recuento de mohos y levaduras Descripción [en línea] 2015. Disponible en: https://www.3m.com/3M/en_US/company-us/all-3m-products/~3M-Clean-Trace-Surface-ATP-Test-Swab-UXL100-100-per-case/?N=5002385+3294778411&rt=rud.

Petrifilm™, 3M. Placas Petrifilm™ para el Recuento de Aerobios AC [en línea] 2015. Disponible en: <https://multimedia.3m.com/mws/media/1409674O/guia-interpretacion-petrifilm-aerobios.pdf>

Petrifilm™, 3M. Placas Petrifilm™ par Recuento de Enterobacterias [en línea] 2017. Disponible en: <https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=&cad=rja&uact=8&ved=2ahUKEwiE3bCiru6AAxWlQjABHcXzDtEQFnoECAkQAQ&url=https%3A%2F%2Fmulti>

media.3m.com%2Fmws%2Fmedia%2F1624089O%2F3m-petrifilm-placas-hongos-y-levaduras-ym-guia-de-interpretacion.pdf&usg=AOvVaw136S-vhpqjBBjc9AM-1Mw&opi=89978449

Petrifilm™, 3M. Staph Express System. 2017

Puebla, J., Fernandez, C., & Illnait, M. Susceptibilidad in vitro de candida spp. aisladas de la cavidad oral de pacientes VIH/sida a itraconazol, clotrimazol y ketoconazol. Scielo [en línea] 2012. Disponible en: http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0798-02642012000400003

Restrepo, K et al. Caracterización de hongos micorrízicos arbusculares de suelos ganaderos del trópico alto y trópico bajo en Antioquia, Colombia. Scielo [en línea] 2019. Disponible en: https://www.scielo.cl/scielo.php?pid=S0718-34292019005000301&script=sci_arttext

Rivas, C., Oranday, M., & Verde, M. (2016). Investigación en plantas de importancia médica (OmniaScience, Ed.). 2016.

Rodriguez, T et al. Identificación de especies de *Candida* de importancia clínica con un método auxonograma modificado [en línea] 2010. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0375-07602010000100008

Sanailán, J. EVALUACIÓN DE LA FORMULACIÓN MAGISTRAL COMO PALIATIVO EN PACIENTES EN LA UNIDAD ONCOLÓGICA SOLCA CHIMBORAZO. 2019

Sánchez, A et al. Cambio de CLSI a EUCAST en la interpretación de la sensibilidad a antimicrobianos: ¿cómo influye en nuestro medio? Elsevier [en línea] 2017. Disponible en: <https://www.elsevier.es/es-revista-enfermedades-infecciosas-microbiologia-clinica-28-articulo-cambio-clsi-eucast-interpretacion-sensibilidad-S0213005X17301210>

Scalvenci, L., & Yaguache, B. Actividad antifúngica in vitro de aceites esenciales de *Ocotea quixos* y *Pipper aduncum* [en línea] 2016. Disponible en: <http://ve.scielo.org/pdf/ba/v28n1/art05.pdf>

STANPA. Cosméticos Microbilógicamente Seguros. Asociación Nacional de Perfumería y Cosmética. [en línea] 2021. Disponible en: <https://www.aemps.gob.es/informa/notasInformativas/cosmeticos-cuidado-personal/2021/guia-conservacion.pdf>

Suárez, L., & Peñaranda, F. Identificación molecular de hongos filamentosos y su potencial biotecnológico. Scielo [en línea] 2022. Disponible en: http://www.scielo.org.co/scielo.php?pid=S1692-35612022000100194&script=sci_arttext

Taudorf, E., Jemec, G., & Saunte, D. Cutaneous candidiasis – an evidence-based review of topical and systemic treatments to inform clinical practice. Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology [en línea] 2019. Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/jdv.15782>

Taylor, M., Brizuela, M., & Raja, A. Oral Candidiasis. Study Guide from StatPearls Publishing, Treasure Island [en línea] 2019. Disponible en: <https://europepmc.org/article/nbk/nbk545282>

Oudaina, W et al. Une ulcération cutanée due à *Rhodotorula mucilaginosa* chez un enfant immunodéprimé. Elsevier [en línea] 2018. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1156523317302494>

UBE. ¿Cómo interpretar un antibiograma? Urología Basada En Evidencia [en línea] 2020. Disponible en: <https://urologiabe.com/2020/08/24/como-interpretar-un-antibiograma/>

Vázquez, D., & Peralta, A. Antimicóticos [en línea] 2015. Disponible en: <https://accessmedicina.mhmedical.com/content.aspx?bookid=1529§ionid=98869977>

Velasteguí, A. Eficacia Antifúngica e Inhibitoria in vitro de Nistatina Versus Aceite Esencial de *Melaleuca alternifolia* sobre *Candida albicans*. Universidad Nacional de Chimborazo [en línea] 2022. Disponible en: <http://dspace.unach.edu.ec/bitstream/51000/9666/1/Velasteguí%20Pazos%2c%20A%282022%29%20Eficacia%20antifúngica%20e%20inhibitoria%20in%20vitro%20de%20Nistatina%20versus%20aceite%20esencial%20de%20Melaleuca%20alternifolia%20sobre%20Candida%20albicans%29Universidad%20Nacional%20de%20Chimborazo%2c%20Riobamba%2c%20Ecuador.pdf>

Vera, A et al. Evaluación de formulaciones de ketoconazol para uso tópico en leishmaniasis cutánea por *Leishmania (Viannia)*. Scielo [en línea] 2018. Disponible en: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1726-46342018000300015

Vieille O., P. Identificación de cepas del complejo *Candida albicans* aisladas de muestras clínicas en la región de Valparaíso, Chile. *Boletín Micológico* [en línea] 2022. Disponible en: <https://doi.org/10.22370/bolmicol.2022.37.1.3217>

Villacís, A., & Ávila, M. Evaluación de susceptibilidad en cándidas spp por colorimetría obtenida en gestantes de un hospital obstétrico. *Scielo*. [en línea] 2020. Disponible en: http://www.scielo.org.bo/scielo.php?pid=S2664-32432020000300012&script=sci_arttext

Zambrano, L. Caracterización de levaduras causantes de fungemia: identificación y sensibilidad antifúngica, epidemiología molecular y factores de patogenicidad. *Universidad Complutense Madrid* [en línea] 2018. Disponible en: <https://docta.ucm.es/entities/publication/64e60d14-af1c-424c-936b-5dbb5a5a421d>



ANEXO A: Certificado de autenticidad de la cepa de *C. albicans*

Riobamba, 02 de mayo del 2023

A petición verbal del interesado, Sr. Iván Daniel Peñaherrera Márquez, portador de la cédula de identidad N° 0604334326.

CERTIFICO

Haber proporcionado una Cepa de *Candida albicans* aislada de una muestra de secreción vaginal, la misma que fue identificada en el Centro de Investigación Microbiológica CIMIC; por tres métodos: desarrollo de colonias de color verde en agar chromagar candida, desarrollo de colonias blancas en agar sabouraud y mediante la realización de la prueba de tubo germinal que dio positivo.

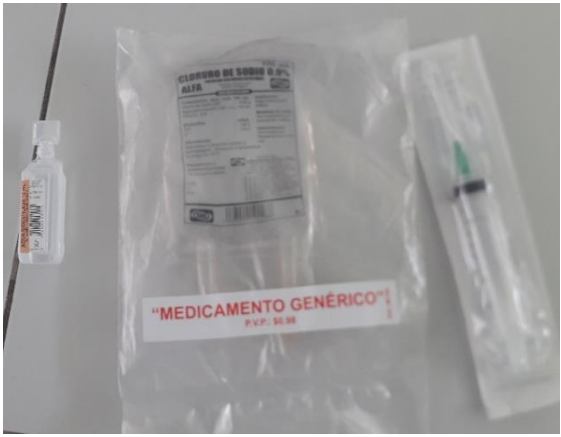


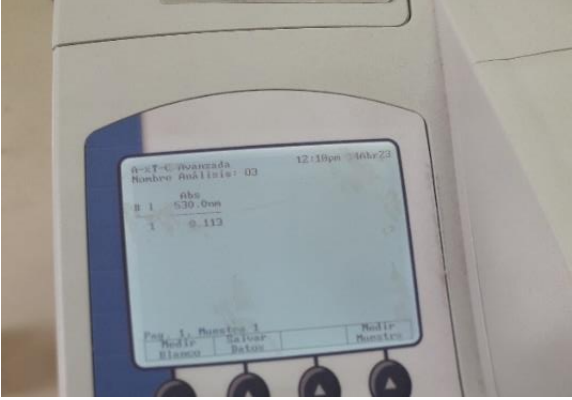
Sirva la presente para los fines que al interesado convengan.

Atentamente:

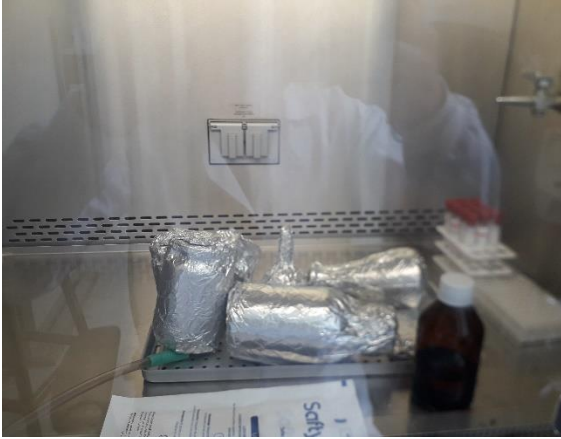



Dra. Andrea Chávez Colcha MSc.
Directora General

Dra. Andrea Chávez C. Msc.
MICROBIÓLOGA
MSP 1006 - 2017 - 1787289

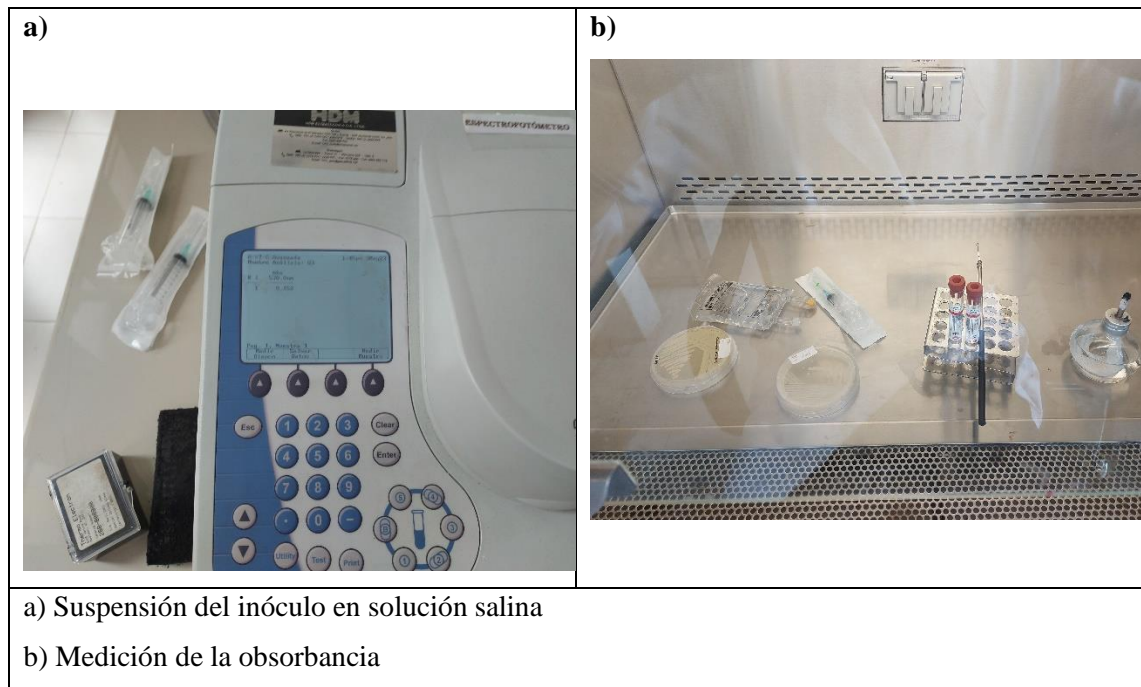
ANEXOS B: Preparación de los reactivos

<p>a)</p> 	<p>b)</p> 
<p>c)</p> 	<p>d)</p> 
<p>a) Preparación de NaCl 0.85%</p> <p>b) Puesta del recipiente de cuarzo</p> <p>c) Lectura de Absorbancia del blanco para McFarland</p> <p>d) Lectura de Absorbancia del blanco para McFarland</p>	

ANEXOS C: Preparación del medio de cultivo

<p>a)</p> 	<p>b)</p> 
<p>c)</p> 	<p>d)</p> 
<p>a) Esterilización de los materiales</p> <p>b) Pesado de los ingredientes</p> <p>c) Ajuste de pH</p> <p>d) Filtración del medio</p>	

ANEXOS D: Preparación del Inóculo



ANEXOS E: Microdiluciones

a)




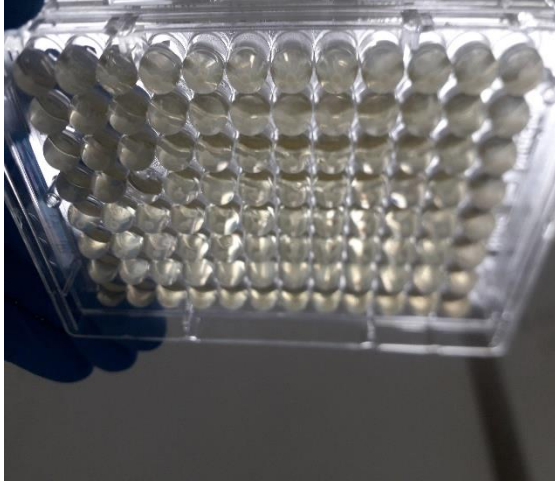

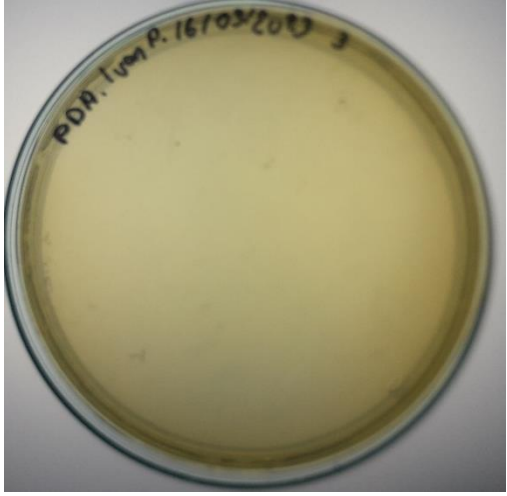
a) Preparación de los materiales

b)







b) Pesado de ketoconazol para la técnica



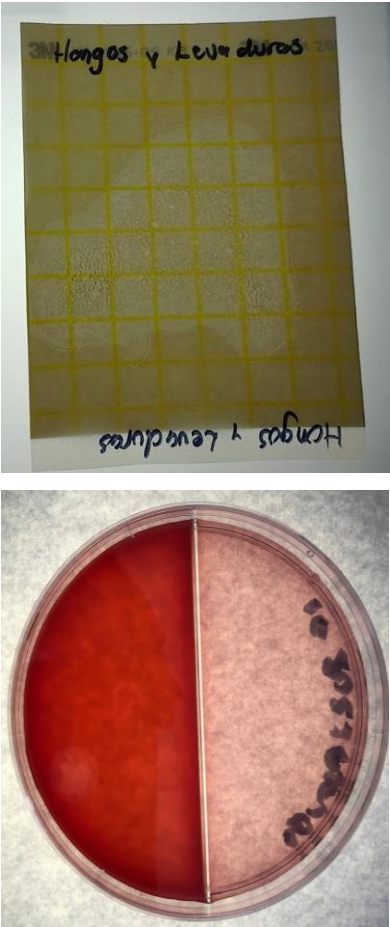
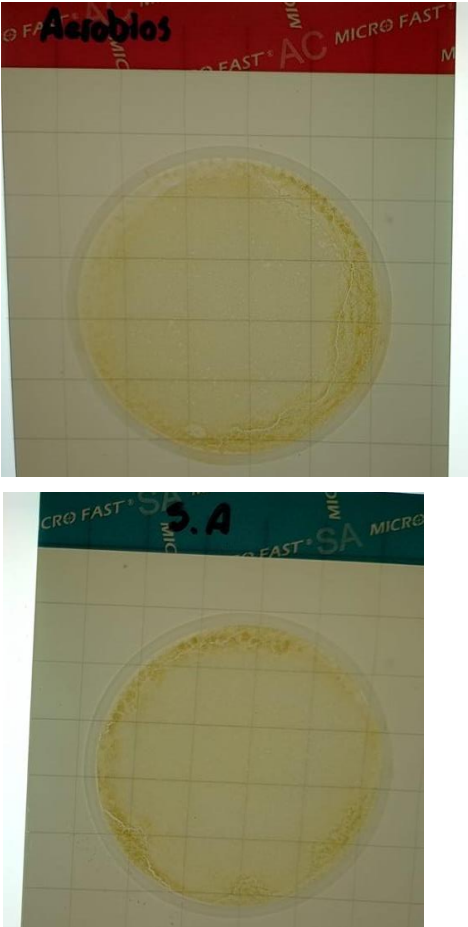
ANEXOS F: Determinación de la CMI y CMF

<p>a)</p> 	<p>b)</p> 
<p>c)</p> 	<p>d)</p> 
<p>a) Plaqueo b) Lectura de la CMI c) Inoculación en placas d) Placa con CMF</p>	

ANEXOS G: Elaboración del gel

<p>a)</p>  <p>A digital scale with a white weighing pan. The display shows '1.201g'. The scale has several buttons: OFF, MODE, UNIT, CAL, and ON/WEIGHT.</p>	<p>b)</p>  <p>A digital scale with a white weighing pan. The display shows '0.180g'. The scale has several buttons: OFF, MODE, UNIT, CAL, and ON/WEIGHT.</p>
<p>c)</p>  <p>An overhead mechanical stirrer (OS40-PRO) is used to mix a white, opaque mixture in a clear glass beaker. A white jug of 'ALCOHOL' is visible in the background.</p>	<p>d)</p>  <p>A dark brown, viscous gel is shown in a clear plastic bottle with a white pump dispenser.</p>
<p>a) Pesado de Carbopol b) Pesado de Ketoconazol pulverizado c) Agitación de la mezcla d) Embazado</p>	

ANEXOS H: Control de calidad

<p>a)</p> 	<p>b)</p> 
<p>c)</p> 	<p>d)</p> 
<p>a) Pesado con picnómetro</p> <p>b) Análisis del pH</p> <p>c) Placas petrifilm para hongos y <i>P.auroginosa</i></p> <p>d) Placas petrifilm para <i>S. aureus</i> y aerobios</p>	



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

**CERTIFICADO DE CUMPLIMIENTO DE LA GUÍA PARA NORMALIZACIÓN
DE TRABAJOS DE FIN DE GRADO**

Fecha de entrega: 31/01/2024

INFORMACIÓN DEL AUTOR
Nombres – Apellidos: Iván Daniel Peñaherrera Márquez
INFORMACIÓN INSTITUCIONAL
Facultad: Ciencias
Carrera: Bioquímica Y Farmacia
Título a optar: Bioquímico Farmacéutico
 Firma del Director del Trabajo de Titulación
 Firma del Asesor del Trabajo de Titulación