



**UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA**

*La Universidad Católica de Loja*

**ÁREA BIOLÓGICA Y BIOMÉDICA**

**BIOQUÍMICO FARMACÉUTICO**

TRABAJO DE TITULACION

**Desarrollo y caracterización de un gel de  
Anfotericina B y aceite esencial de palo santo (*Bursera  
graveolens*) con actividad antimicótica.**

**Autor (a):** Chulca Torres, Brenda de los Angeles

**Director (a):** Espinoza Tituaña, Lupe Carolina

LOJA – ECUADOR

2020



*Esta versión digital, ha sido acreditada bajo la licencia Creative Commons 4.0, CC BY-NC-SA: Reconocimiento-No comercial-Compartir igual; la cual permite copiar, distribuir y comunicar públicamente la obra, mientras se reconozca la autoría original, no se utilice con fines comerciales y se permiten obras derivadas, siempre que mantenga la misma licencia al ser divulgada. <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/deed.es>*

2020

**Aprobación de la directora del Trabajo de Titulación**

Loja, 06 de octubre de 2020

Magister.

Claudia Teresa Cruz Erazo

**Coordinadora de la Titulación de Bioquímica y Farmacia**

De mi consideración:

El presente trabajo de titulación: Desarrollo y caracterización de un gel de Anfotericina B y aceite esencial de palo santo (*Bursera Graveolens*) con actividad antimicótica, realizado por Chulca Torres, Brenda de los Angeles ha sido orientado y revisado durante su ejecución, por cuanto se aprueba la presentación del mismo. . Así mismo, doy fe que dicho Trabajo de Titulación ha sido revisado por la herramienta antiplagio institucional.

Particular que comunico para los fines pertinentes.

Atentamente,

Firma.....

Lupe Carolina Espinoza Tituaña

CI:

### **Declaración de Autoría y Sesión de Derechos**

“Yo, Chulca Torres Brenda de los Angeles, declaro y acepto en forma expresa lo siguiente:

- Ser autor(a) del Trabajo de Titulación denominado: Desarrollo y caracterización de un gel de Anfotericina B y aceite esencial de palo santo (*Bursera Graveolens*) con actividad antimicótica, específicamente de los contenidos comprendidos en: se debe colocar los nombres de los capítulos elaborados en el Trabajo de Titulación, por ejemplo. Introducción, Capítulo 1. Marco teórico de la pobreza y las políticas públicas, Capítulo 2. Evidencia empírica. Metodología de la investigación, Capítulo 3. Descripción de la población seleccionada, Capítulo 4. Relato del hogar, Conclusiones y Recomendaciones, siendo nombres y apellidos completos, director (a) del presente trabajo; y, en tal virtud, eximo expresamente a la Universidad Técnica Particular de Loja y a sus representantes legales de posibles reclamos o acciones judiciales o administrativas, en relación a la propiedad intelectual. Además, ratifico que las ideas, conceptos, procedimientos y resultados vertidos en el presente trabajo investigativo son de mi exclusiva responsabilidad.
- Que mi obra, producto de mis actividades académicas y de investigación, forma parte del patrimonio de la Universidad Técnica Particular de Loja, de conformidad con el artículo 20, literal j), de la Ley Orgánica de Educación Superior; y, artículo 91 del Estatuto Orgánico de la UTPL, que establece: “Forman parte del patrimonio de la Universidad la propiedad intelectual de investigaciones, trabajos científicos o técnicos y tesis de grado que se realicen a través, o con el apoyo financiero, académico o institucional (operativo) de la Universidad”.
- Autorizo a la Universidad Técnica Particular de Loja para que pueda hacer uso de mi obra con fines netamente académicos, ya sea de forma impresa, digital y/o electrónica o por cualquier medio conocido o por conocerse, sirviendo el presente

instrumento como la fe de mi completo consentimiento; y, para que sea ingresada al Sistema Nacional de Información de la Educación Superior del Ecuador para su difusión pública, en cumplimiento del artículo 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Firma: .....

Autor: Chulca Torres Brenda de los Angeles

C.I.: 0502883499

## **Dedicatoria**

A mis abuelitos Charito Correa y Carlos Torres que me han acogido en su hogar desde que era una pequeña y me han apoyado cada momento de mi vida, agradezco su paciencia, su ejemplo y sobre todo su cariño que late como un arrullo de un picaflor en mi corazón cada momento y por ser el mejor regalo de la vida, a mi madre Rita que su esfuerzo ha sido grande y venturoso siempre por vernos bien, a mis ñañas Alis y Emily que han sido un pilar fundamental en mi vida. A mis tías Maribel y Georgina por su bondad, su cariño, sus consejos que a pesar de la distancia no se ha perdido el constante florecimiento de cariño y apoyo. Los quiero.

## **Agradecimiento**

A mis abuelitos, a mi madre, a mi familia por su apoyo incondicional.

A los docentes de la carrera de Bioquímica y Farmacia que han sido portavoces de los conocimientos necesarios para ejercer la carrera. En especial a la Mgs. Lupe Espinoza que ha sabido brindarme su confianza, la paciencia y su conocimiento ha permitido desarrollar este tema de tesis, al Mgs. Santiago Ojeda que muy amable ha aportado su conocimiento en el desarrollo de mi tesis, a ellos que sin pensar me acogieron en el laboratorio de tecnología farmacéutica y se convirtieron en personas muy especiales que dejan una gran marca en mi vida y en el ámbito profesional.

A Paulo Sarango que amablemente me ha acompañado con la realización de mi tesis, siempre dispuesto a ayudar.

A mis amigos que llevo un gran recuerdo en mi mente y en mi corazón que también me han apoyado en el transcurso de mi carrera Valki, Cindy, Magie, Nico, Barbi, Wilmer. A mi compañero Oscar que me ha brindado su apoyo gentil y conocimiento en el desarrollo de mi tesis. A Byron, Mateo a mis amigos poetas, por el acolite.

## Contenido

Aprobación de la directora del Trabajo de Titulación .....	ii
Declaración de Autoría y Sesión de Derechos .....	iii
Dedicatoria .....	v
Agradecimiento .....	vi
Introducción.....	3
Capítulo I.....	5
Marco teórico .....	5
1. Hongos.....	5
1.1. Micosis .....	5
1.2. Género Candida.....	6
1.2.1. <i>Candida albicans</i> .....	6
1.3. Candidiasis .....	8
1.3.1. Candidiasis cutánea.....	9
1.3.2. Tratamiento de la candidiasis cutánea .....	9
1.4. Anfotericina B.....	11
1.5. Productos naturales con actividad antimicótica .....	14
1.6. <i>Bursera graveolens</i> .....	15
<i>Bursera Graveolens. A: Distribución Geográfica en la provincia de Loja. B:</i> <i>Aspecto general del árbol. C: Partes del árbol (frutos, hojas, astillas, resina) .....</i>	15
1.7. Generalidades de la piel.....	16
1.8. Ventajas de la administración por vía dérmica .....	18
1.9. Promotores químicos de permeación .....	18

1.10.	Geles y su clasificación .....	19
1.10.1.	Principales componentes de los geles .....	21
1.11.	Control de calidad de producto terminado .....	22
Capitulo II	.....	23
Metodología	.....	23
2.	Ensayos de preformulación .....	23
2.1.	Estudios de solubilidad.....	23
2.2.	Estudio de Compatibilidad mediante el Diseño factorial completo $2^3$ ..	23
2.3.	Optimización del método de elaboración.....	24
2.4.	Selección de la fórmula final para un gel de AmB y un gel de AmB más aceite de palo santo .....	25
2.5.	Caracterización fisicoquímica de las fórmulas finales.....	25
2.5.1.	Aspecto.....	25
2.5.2.	Presencia de grumos .....	25
2.5.3.	Evaluación de pH.....	25
2.5.4.	Evaluación de la viscosidad .....	26
2.5.5.	Evaluación de la extensibilidad .....	26
2.6.	Contenido de fármaco .....	26
2.6.1.	Preparación de la curva de calibrado .....	27
2.6.2.	Preparación de las muestras.....	27
2.7.	Eficacia .....	27
2.7.1.	Pre incubación bacteriana de <i>Cándida albicans</i> .....	27
2.8.	Prueba de microdilución en caldo CMI .....	27

2.9. Estudios de estabilidad física y química de los geles de AmB con aceite de palo y sin aceite de palo santo .....	28
2.10. Estabilidad física.....	28
2.10.1. Determinación de precipitados.....	28
2.10.2. Estabilidad por Termorresistencia.....	28
2.10.3. Estabilidad química.....	29
Capitulo III.....	30
Resultados y Discusión .....	30
3. Preformulación .....	30
3.1. Solubilidad .....	30
3.2. Estudio de Compatibilidad mediante el Diseño Factorial Completo $2^3$	31
3.3. Selección de la formulación.....	32
3.4. Estudios de efectos e interacciones entre los diferentes factores del Gel AmB+PS34	
3.5. Caracterización fisicoquímica de la fórmula final.....	37
3.5.1. Características organolépticas.....	37
3.5.2. Análisis de pH.....	37
3.5.3. Análisis de extensibilidad.....	37
3.5.4. Análisis de viscosidad.....	38
3.6. Contenido de fármaco.....	39
3.7. Evaluación de eficacia por el método de concentración mínima inhibitoria en caldo .....	40
3.8. Control de Calidad del producto .....	42
3.8.1. Estudios de estabilidad física y química.....	42

3.8.2. Estudios de estabilidad de las propiedades organolépticas y físicas	
42	
3.9. Estabilidad Química .....	45
Referencias .....	50

**Índice de Tablas**

<b>Tabla 1</b> .....	8
<b>Tabla 2</b> .....	11
<b>Tabla 3</b> .....	12
<b>Tabla 4</b> .....	14
<b>Tabla 5</b> .....	15
<b>Tabla 6</b> .....	19
<b>Tabla 7</b> .....	20
<b>Tabla 8</b> .....	22
<b>Tabla 9</b> .....	23
<b>Tabla 10</b> .....	24
<b>Tabla 11</b> .....	31
<b>Tabla 12</b> .....	31
<b>Tabla 13</b> .....	33
<b>Tabla 14</b> .....	33
<b>Tabla 15</b> .....	36
<b>Tabla 16</b> .....	37
<b>Tabla 17</b> .....	40
<b>Tabla 18</b> .....	44
<b>Tabla 19</b> .....	45
<b>Tabla 20</b> .....	46
<b>Tabla 21</b> .....	47

**Índice de Figuras**

<b>Figura 1</b> .....	7
<b>Figura 2</b> .....	12
<b>Figura 3</b> .....	13
<b>Figura 4</b> .....	15
<b>Figura 5</b> .....	17
<b>Figura 6</b> .....	35
<b>Figura 7</b> .....	36
<b>Figura 8</b> .....	37
<b>Figura 9</b> .....	39
<b>Figura 10</b> .....	40

## Resumen

En el presente estudio se elaboró un gel antifúngico de anfotericina B al 0.1% y aceite de palo santo (*Bursera graveolens*), para el desarrollo de la formulación magistral se realizaron estudios de pre formulación y formulación, para el diseño de la preformulación utilizamos un diseño factorial completo  $2^3$  en el programa estadístico STATGRAPHICS, los resultados permitieron conocer la fórmula más estable que presentó menor interacción y menores efectos entre excipientes. La muestra que se presentó más estable contenía CMC (carboximetilcelulosa) como polímero, propilenglicol como cosolvente y benzoato de sodio como conservante. De la misma manera se realizó un análisis mediante la técnica cromatográfica cuantitativa HPLC que permitió conocer la concentración del fármaco, además se realizó análisis de efectividad: pruebas microbiológicas de CMI (concentración mínima inhibitoria) finalmente las muestras se sometieron a estabilidad acelerada. De esta manera se pudo garantizar la eficacia que brinda el gel obteniendo resultados satisfactorios para el tratamiento de candidiasis cutánea

**Palabras clave:** *anfotericina B, palo santo, gel, candidiasis cutánea.*

### Abstract

In this present study an antifungal gel whit amphotericin B 0,1% and Palo santo (*Bursera graveolens*) oil was elaborate. for the development of the magisterial formulation, pre-formulation and formulation studies were carried out, for the preformulation design we used a full factorial design  $2^3$  in the statistical program STATGRAPHICS, the results allowed to know the formula that presented minor effects and interactions with the other excipients and therefore these factors do not influence the effectiveness of the formulation. The formulation that was chosen contained CMC as a polymer, propylene glycol as a cosolvent, and sodium benzoate as a preservative. Likewise, an analysis was carried out using the quantitative chromatographic HPLC technique that will get to know the concentration of the drug, in addition, effectiveness tests were carried out: microbiological tests of MIC (minimum inhibitory concentration) obtaining satisfactory results. Finally, the tests were subjected to stability by a time of 4 months where the samples presented certain changes, but their values are not significant, considering their ideal results for the treatment of cutaneous candidiasis.

**Key words:** amphotericin B, palo santo, gel, antifungal.

## Introducción

Considerando que no hay formulaciones tópicas de AmB disponibles comercialmente, el objetivo del presente fue desarrollar y caracterizar un gel en cuya composición contenga Anfotericina B como principio activo y aceite de palo santo como promotor de permeación y potenciador de la eficacia antimicótica para el tratamiento de la candidiasis cutánea provocada por *Candida albicans*. Lo cual se pudo demostrar gracias a los diferentes estudios que se realizaron, siguiendo los apartados farmacéuticos de la USP 33, 2010 de algunas de artículos científicos y otras encontradas en tesis. Las oportunidades que brinda el desarrollo del tema es que gracias a ello se adquieren nuevos conocimientos, así mismo la experiencia para realizar los diferentes ensayos que serán útiles para el desempeño laboral. Los limitantes que se presentaron en el desarrollo de la investigación fueron: el daño del equipo HPLC para cuantificar el fármaco generó que se aplazaran los estudios, la pandemia generada por el coronavirus que como tal nos complicó los realizar los ensayos requeridos en el tiempo designado.

La importancia del desarrollo de nuevas formulaciones que contengan aceites esenciales es que potencien la acción de la formulación, reduzca la resistencia y recidivas de la enfermedad debido a que últimamente se han registrado casos de resistencias a los antifúngicos especialmente a los azoles, además los aceites esenciales han sido utilizados desde tiempos ancestrales y se utiliza dentro de la industria farmacéutica, cosmética y alimentaria ya que brindan un aroma agradable , debido a su alta composición en compuestos terpenos incrementan la difusión de moléculas lipofílicas a través de la piel demostrado un gran potencial como antimicrobianos, poseen una gran actividad antiinflamatoria (Manzano et al., 2009) y sobre todo es importante para la industria farmacéutica ya que no existen formulaciones en el mercado farmacéutico en presentación de geles que contengan AmB y adicional el aceite de palo santo.

Las micosis de piel y mucosas representan un grave problema a nivel mundial, afectando a personas de todas las edades, representando entre un 5 a 10% de las consultas a nivel dermatológico. Estudios realizados en Ecuador por Chiriboga &

Aguinaga, 2018 observaron un incremento significativo de las enfermedades micóticas, la aparición de nuevas formas clínicas de micosis como en su localización. De hecho, la infección por hongos posee un amplio espectro, que va desde una infección de la piel, hasta sistémica involucrando la vida del paciente (Allevato, 2007; Zurita, 2017). La especie de hongos que se asocia con mayor frecuencia en este tipo de infecciones es *Candida albicans* posee una gran adherencia a los tejidos que le facilita su proliferación afectando a la piel, mucosas (oral, vulvo vaginal) y uñas. Sus manifestaciones clínicas van desde agudas a crónicas (Palacios, L, & Cardona, 2011).

El desarrollo de nuevas moléculas tópicos y orales ha permitido mejorar el tratamiento de las micosis superficiales. Entre los fármacos utilizados para el tratamiento de hongos destacan: fluconazol, itraconazol y terbinafina, anfotericina B (Yauri, Chambilla, & Diaz), flucitosina, griseofulvina, nistatina y solución de yoduro de potasio. Siendo la AmB un fármaco perteneciente al grupo de los macrólidos poliénicos actúa directamente con el ergosterol de la membrana celular del hongo, lo que facilita la formación de canales con la pérdida consecuente de iones y componentes celulares ocasionando muerte celular. Sin embargo, a pesar de este hecho resulta ser un antifúngico de toxicidad muy elevada. El desarrollo de productos de uso tópico sobre el área afectada es una estrategia útil para la reducción de los efectos tóxicos de fármacos como la AmB. La eficacia de los principios activos administrados por esta vía depende de su permeación a través del estrato corneo, la capa más externa de piel que actúa como barrera para el paso de sustancias extrañas (Allevato, 2007; Durán et al., 2012; Gubelin et al., 2011; Sosa et al., 2019).

El desarrollo y optimización de formulaciones que permitan vehiculizar fármacos ha sido siempre una actividad para el tratamiento de diversas enfermedades; los geles son utilizados para muchas aplicaciones como productos dermatológicos, dentales, vaginales, nasales y oftálmicos, esto debiéndose a todas las propiedades que poseen como buena viscosidad, extensibilidad, estabilidad a pH ácido, no son irritantes, no provocan sensibilización, no se licuan a la temperatura corporal y sobre todo presenta una fácil preparación (Villa, 2001).

## Capítulo I

### Marco teórico

#### 1. Hongos

Los hongos son organismos eucariotas heterótrofos pertenecientes al reino fungi (Campozano & Heras, 2014), en los que se incluyen a los mohos, setas y levaduras (Aizaga, 2017); obtienen su alimento de materia en descomposición y la utilizan como fuente de energía y carbono, su crecimiento es a través de las hifas, su reproducción es asexual o por esporas de forma sexual (Cuenca, 2012). Existe una variedad de hongos con características saprofíticas, es decir, que pueden convivir de forma permanente con el hombre sin causar infección, sin embargo, a ciertas condiciones éstos pueden comportarse como agentes patógenos y propiciar enfermedades (Garrote, 2002).

##### 1.1. Micosis

Las micosis son infecciones producidas por hongos con la capacidad de invadir diferentes tejidos superficiales como piel, pelo y uñas, si se presenta una infección sistémica pueden involucrar la vida de una persona debido a que los hongos atacan a los órganos internos a través del torrente sanguíneo. Las micosis se dividen dependiendo de su localización:

- Micosis superficiales: Se generan al entrar en contacto directo con una persona o animal infectado, este tipo de micosis invaden el tejido queratinizado (piel, uñas, pelo) (España & Espinoza, 2019). Entre las más comunes encontramos a los dermatofitos (*Trichophyton*, *Epidermophyton* y *Microsporum*), levaduriformes (*Candida spp.*, *Cryptococcus* y *Malassezia*), *Cladosporium werneckii*, *Tricosporum beigellii*, entre otros (Gubelin et al., 2011).

- Micosis subcutáneas: Se producen debajo de la piel afectando al tejido celular subcutáneo. La infección ocurre cuando existe implantación de esporas o fragmentos del micelio en una herida punzante. Los hongos que participan en esta infección poseen la capacidad de degradar la queratina.
- Micosis sistémicas o profundas: Un grupo de hongos que forman parte de la microbiota normal de los humanos pero que por alguna condición determinada (aumento en el número de hongos) pueden transformarse en patógenos para el huésped. Estos pueden afectar a cualquier órgano, aparato o sistema, las esporas del hongo penetran por inhalación, después ocurre, colonización. Los de mayor importancia en dermatología son: *Candida spp* y *Malassezia spp* (Sánchez-Saldaña et al., 2009).

## 1.2. Género *Candida*

Es un grupo de levaduras ubicuas que poseen diversas características y forman parte de la microflora humana. Sin embargo, tras alteraciones en el huésped, algunas de estas especies fúngicas pueden convertirse en patógenos oportunistas, aprovechándose de varios factores como el deterioro del sistema inmune, y de esta manera proliferar en el huésped y causar enfermedades conocidas habitualmente como “candidiasis” (Ghazi et al., 2019). Este género abarca más de un centenar de especies, de las que solamente unas cuantas actúan como patógenos para el ser humano, entre ellas encontramos a: *Candida albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. kefyr*, *C. lusitaniae*, *C. dubliniensis*, *C. parapsilosis*, *C. rugosa*, entre otras (Caballero et al., 2005).

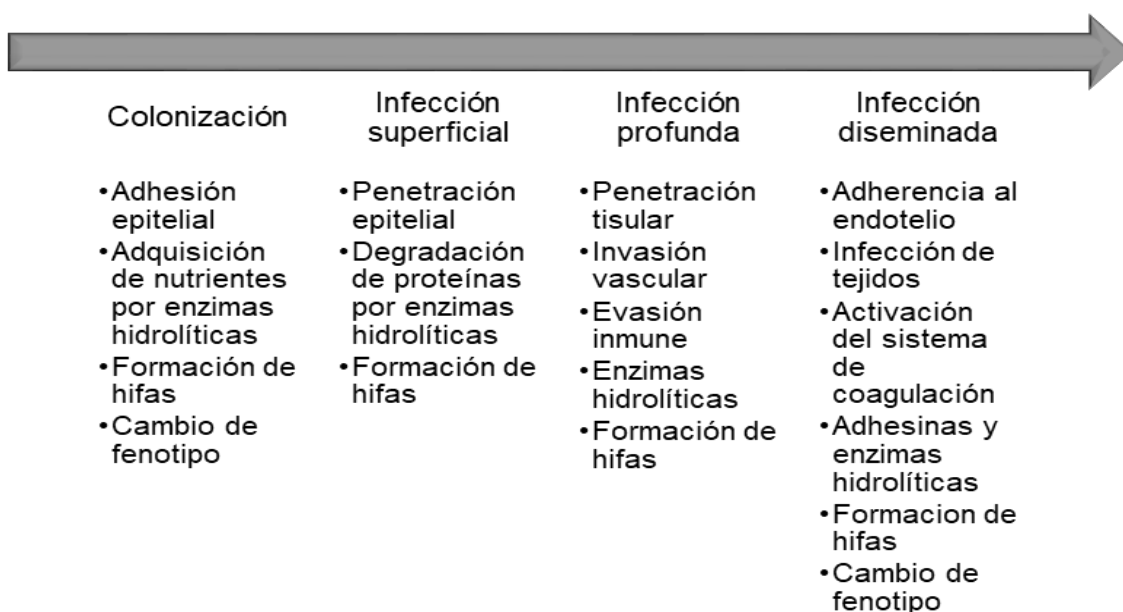
### 1.2.1. *Candida albicans*

Es un hongo dimórfico debido a que puede presentar una morfología levaduriforme o bien crecer como un hongo filamentoso formando hifas verdaderas. La taxonomía se describe en la (Tabla 1). Como levadura, normalmente a 37°C en el huésped miden entre 3 a 8  $\mu\text{m}$  y se las observan agrupadas en pequeños grupos saprofiticos del hombre; como hongo filamentoso, a 25°C se puede comportar como un organismo patógeno produciendo síntomas característicos. Macroscópicamente, en agar Sabouraud, crece formando colonias blancas, blandas, cremosas y lisas (De La Calle et al., 2012; Guerrero, 2016).

Los factores de virulencia de la *C. albicans* incluyen su pericia para sobrevivir como comensal, su adherencia a células, cambio morfológico y secreción de enzimas degradativas; según De La Calle et al 2012, a partir de estos factores de virulencia la infección por *C. albicans* puede dividirse en 4 etapas, tal y como lo muestra la (Figura 1)

**Figura 1**

*Etapas de la infección por C. albicans y mecanismos de virulencia que intervienen en cada una de las etapas.*



Nota. De La Calle et al., 2012, reeditada por el autor.

**Tabla 1***Clasificación taxonómica de C. albicans*

<b>Reino</b>	Fungi
<b>Filo</b>	Ascomycota
<b>Subfilo</b>	Saccharomycotina
<b>Clase</b>	Saccharomycetes
<b>Orden</b>	Saccharomycetales
<b>Familia</b>	Saccharomycetaceae
<b>Género</b>	Candida
<b>Especie</b>	Candida albicans

Nota. (Garza, 2012).

### 1.3. Candidiasis

Es una enfermedad infecciosa producida por levaduras del género *Candida* spp. La especie involucrada como agente etiológico es *Candida albicans*. *C. albicans* está presente en la microbiota gastrointestinal, vaginal, orofaríngea, piel periorificial y algunos pliegues cutáneos. La capacidad que presenta este organismo para producir patología depende de la interacción entre los mecanismos patogénicos del hongo y los sistemas de defensas cutáneos y sistémicos del propio huésped, sin conocer el tiempo preciso de incubación, este mecanismo de defensa puede variar entre personas (Gubelin et al., 2011; Spampinato & Leonardi, 2013).

La candidiasis es una enfermedad de distribución universal, que puede establecerse en personas de cualquier sexo, de todas las edades, desde lactantes hasta adultos mayores. Las infecciones causadas por hongos tienen una alta morbilidad, afectan a 1,5 billones de personas, el 25% de la población mundial (Carretero, 2009). En Latinoamérica, las infecciones causadas por hongos han aumentado progresivamente (Cuenca, 2012). En un estudio realizado en el Ecuador por España & Espinoza, 2019 en el Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública (INSPI) Dr. Leopoldo Izquieta Pérez encontraron que existe una frecuencia del 44.8% en dermatofitos, 49.4% en levaduras, 5.8% en no dermatofitos, encontrando

con mayor frecuencia tiña corporis con su agente causal *Candida* spp 44% y tiña capitis con *Microsporum* spp 47%. Encontrando que *Candida* tuvo mayor prevalencia, siendo mayormente afectados niños y adultos.

### **1.3.1. Candidiasis cutánea**

La candidiasis cutánea se caracteriza por la presencia de placas rojas, pustulosas, costrosas y gruesas similares a las que se observan en la psoriasis, sobre todo en la nariz y la frente y se asocian siempre con candidiasis bucal crónica. Están relacionadas con alteraciones en la hidratación y cambios en el pH de la piel, boca, faringe y otros tejidos superficiales. Los síntomas varían de acuerdo con el lugar de localización esta infección se puede presentar como intétrigo candidiásico en áreas genitocrural, axilar, glútea, interdigital, inframamaria y entre los pliegues de la pared abdominal. Se puede presentar comúnmente entre el tercer y cuarto dedo, la lesión se presenta como una lesión descamativa y, también se puede presentar como muguet con manchas blancas de aspecto cremoso localizadas en la mucosa bucal. En la candidiasis genital se presenta en la mucosa no queratinizada y los síntomas son prurito, secreción vaginal y disuria. En la onicomycosis la infección inicia en la zona periungual con aspecto hinchado, con posible exudación purulenta y dolor al tacto (Bohórquez-Peláez & Cardona-Castro, 2010; Caballero et al., 2005).

### **1.3.2. Tratamiento de la candidiasis cutánea**

Existen diversos tratamientos de la candidiasis cutánea, muchos de ellos van desde un tratamiento oral a un tratamiento sistémico dependiendo de la gravedad de la infección (Del Nogal et al., 2001; Martín-Aragón & Benedí, 2004).

- **Tratamiento oral:** Es el indicado cuando las micosis se producen en zonas de piel que tienen difícil acceso por vía tópica, cuando el tratamiento no ha tenido una buena respuesta o si es una infección

grave. El principal medicamento que se recomienda administrar es el fluconazol debido a su eficacia y buena aceptación por parte del paciente.

- **Tratamiento sistémico:** Es más efectivo y se aplica en casos de lesiones extensas, hiperqueratósicas, zonas inflamatorias o con foliculitis, así mismo para tratar diferentes tipos de tiñas y candidemias diseminadas. Los medicamentos que utilizan son Anfotericina B (y sus formulaciones lipídicas) sin embargo, se ha descrito su elevada toxicidad, también se utilizan diversos derivados de azoles, equinocandinas, flucitosina.

En la mayoría de los antimicóticos tópicos y sistémicos el principal mecanismo de acción es el bloqueo de la síntesis de la membrana de la célula fúngica (Swinne et al., 2005). Existen varios fármacos en presentación de crema, loción o ungüento. Para el tratamiento de candidiasis cutánea se recomienda administrar triazoles o polienos tópicos como nistatina, clotrimazol y miconazol (Armstrong et al., 2016). Los antifúngicos tópicos (Tabla 2) que se utilizan para el tratamiento de dermatofitos en pacientes inmunocomprometidos no resultan tan efectivos, sin embargo, han demostrado que presentan menos efectos adversos que los antifúngicos sistémicos (Maniscalchi et al., 2004). Se recomienda aplicar nistatina en pomada cada 12 h, durante 10 a 15 días; los derivados imidazólicos, 2 veces al día durante 10 o 15 días; las alilaminas, una sola aplicación diaria durante 1 semana, y el ciclopirox, 2 veces al día durante 15 día (Gimeno-Carpio, 2006). En el intertrigo se deben aplicar formas galénicas del tipo loción, a la vez que hay que evitar la humedad persistente y el resto de los factores condicionantes (Sosa, 2018).

**Tabla 2**

*Tratamientos actuales para Candidiasis cutánea*

<b>Grupos</b>	<b>Descripción</b>
<b>Azoles</b>	<p>Son actualmente los fármacos de elección para casi todo tipo de micosis cutáneas, junto con las alilaminas. Son efectivos frente a dermatofitos, <i>Candida</i> spp. y <i>Malassezia</i> spp. Los azoles son activos por vía tópica, debido a su lipofilia y su bajo peso molecular, lo que les permite dispersarse en el estrato córneo y penetrar dentro de la pared celular del hongo. Estos actúan en la membrana celular encontramos al fluconazol voriconazol, posaconazol.</p> <p>En este grupo también actúa en la membrana celular inhibiendo a la enzima escualenoepoxidasa disminuyendo la concentración de ergosterol como tal desestabiliza a la membrana celular aumentando la permeabilidad disminuyendo el crecimiento del patógeno (Sosa, 2018). Se comportan como fungicidas, y los más importantes son: la nafatfina, sólo de uso tópico también propiedades antiinflamatorias que ayudarán a mejorar el estado de las lesiones micóticas y a la terbinafina se la administra cuando no hay una buena respuesta al tratamiento tópico.</p>
<b>Alilaminas</b>	<p>Estos fármacos se unen al ergosterol presente en la membrana celular fúngica, donde se forman poros que alteran la permeabilidad de la membrana lo que permite una pérdida de proteínas, glúcidos y cationes monovalentes y divalentes, causas de la muerte celular. Encontramos a la AmB y a la nistatina</p>
<b>Polienos</b>	<p>se emplea para tratar candidiasis oral esofágica, vulvovaginal en dosis elevadas por un tiempo de 3 o 4 días, en vía cutánea se aplica crema, pomada o polvo que contenga 100.000 unidades / g en la zona afectada 2-3 veces por día. Se recomienda mantener el área seca evitando vendajes. Sin embargo, se ha descrito poca utilidad para tratar dermatofitos.</p>

Nota.(Conejo Fernández et al., 2016; Garrote, 2002; Parada, 2015).

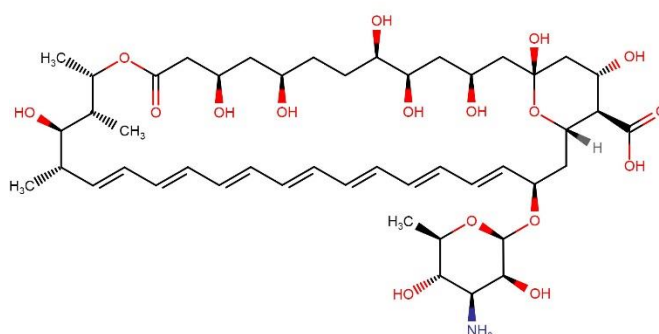
#### **1.4. Anfotericina B**

Es un antibiótico poliénico (Figura 2) de color amarillo-anaranjado, obtenido a nivel industrial a partir de determinadas cepas de *Streptomyces nosodus* (Serrano, 2013). Muestra un alto orden de actividad in vitro contra muchas especies de hongos (Tabla 3). *Histoplasma capsulatum*, *Coccidioides immitis*, especies de *Candida*, *Blastomyces dermatitidis*, *Rhodotorula*, *Cryptococcus neoformans*, *Sporothrix*

*schenckii*, *Mucor mucedo* y *Aspergillus fumigatus* están inhibidas por concentraciones de anfotericina B que varían de 0.03 a 1.0 µg/mL in vitro. Mientras que *Candida albicans* es generalmente bastante susceptible a la anfotericina B, las especies no *albicans* pueden ser menos susceptibles. *Pseudallescheria boydii* y *Fusarium sp.* a menudo son resistentes a la anfotericina B.

**Figura 2**

*Estructura Química de Anfotericina B*



**Nota.** (Serrano, 2013).

**Tabla 3**

*Espectro antifúngico de Anfotericina B y otro antifúngicos frente a diversas cepas*

	Anfotericina B	Fluconazol	Itraconazol	Voriconazol	Caspofungina
<i>Candida</i>	+++	+++	+++	+++	+++
<i>C. glabrata</i>	+++	-	+	++	+++
<i>C. krusei</i>	+++	-	+	++	+++
<i>Aspergillus</i>	+++	-	+++	+++	+++
<i>Mucor</i>	+++	-	-	-	-
<i>Cryptococcus</i>	+++	+++	++	+++	-
<i>Fusarium</i>	+ / ++	-	- / +	++	-
<i>Scedosporium</i>	+ / ++	-	- / +	++	-

+++ = Actividad frente a todas las cepas; ++ = Actividad frente a gran parte de cepas; + = Actividad frente algunas cepas; y, - = Ninguna actividad

Nota. (Catalán & Montejo, 2006).

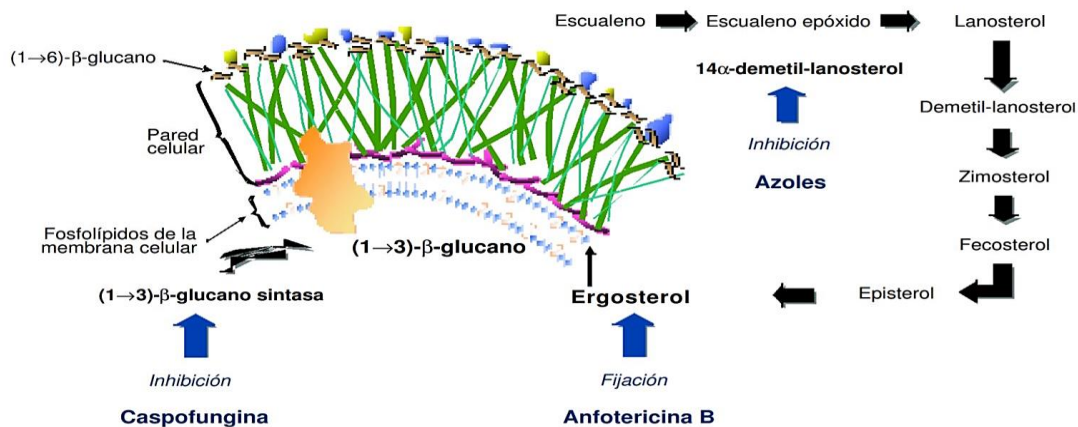
AmB es fungistática o fungicida, dependiendo de la concentración obtenida en los fluidos corporales y la susceptibilidad del hongo. El medicamento actúa uniéndose a los esteroides (ergosterol) en la membrana celular de los hongos susceptibles. Esto

crea un canal transmembrana y el cambio resultante en la permeabilidad de la membrana que permite la fuga de componentes intracelulares. El ergosterol, el esteroide principal en la membrana citoplasmática fúngica, es el sitio de acción objetivo de la anfotericina B y los azoles. La anfotericina B, un polieno, se une irreversiblemente al ergosterol, lo que da como resultado la interrupción de la integridad de la membrana y, en última instancia, la muerte celular (Figura 3) (Stone et al., 2016).

AmB posee una absorción oral mínima 5%, por lo que se elige administrar vía intravenosa para el tratamiento de IFI (Infecciones fúngicas invasoras), se unen ampliamente a lipoproteínas del plasma 90-95%. El volumen de distribución es elevado 4L/kg, alcanzando altas concentraciones en hígado, bazo, pulmón y riñones; en líquido pleural, peritoneal, sinovial y humor acuoso las concentraciones alcanzadas del fármaco son del 50-60% de la concentración plasmática mínima. En líquido cefalorraquídeo presenta una baja penetración 2-4%, aumentando en casos de inflamación meníngea. Atraviesa bien la placenta. Es metabolizada parcialmente en hígado y eliminada por la bilis <15% y por la orina existe una escasa proporción entre 4 a 5% (Catalán & Montejo, 2006). Actualmente las presentaciones en gel de anfotericina se encuentran en estudio, asimismo otras presentaciones en forma de nanopartículas, microtubos, nanoemulsiones y nanogeles (Sosa, 2018).

### Figura 3

#### Mecanismo de acción de Anfotericina B y otros antifúngicos



Nota. Catalán & Montejo, 2006.

### 1.5. Productos naturales con actividad antimicótica

Las especies vegetales conocidas por su actividad antimicótica oscilan entre las 250 000 y 500 000 (Cowan, 1999). Las plantas sintetizan metabolitos secundarios que utilizan para defenderse de la infección ocasionada por agentes fitopatógenos, entre ellos los hongos. Actualmente se han conseguido variados agentes antimicóticos de las plantas y que se han probado tanto in vitro como in vivo, dando muy buenos resultados (Cechinel-Filho, 2012; Verpoorte, 1998) (Tabla 4). De hecho, se ha informado de la actividad antifúngica de algunos componentes principales de los aceites esenciales (Manohar et al., 2001; Mondello et al., 2006). Un estudio realizado por (Dalleau et al., 2008) demostraron la actividad de los terpenos y la eficacia del carvacol, geraniol y timol en el tratamiento de la candidiasis, asimismo, (Zore et al., 2011) exhibieron una excelente actividad de los terpenoides frente a levaduras e hifas de *C. albicans*.

**Tabla 4**

*Productos con actividad antimicótica obtenida de plantas*

Compuesto	Fuente	Actividad
Aceite del árbol del té (terpinen-4-ol y 1,8-cineol)	<i>Melaleuca alternifolia</i>	<i>Candida</i> , <i>Malassezia</i> , dermatofitos.
Ajoeno	<i>Allium sativum</i>	<i>Candida</i> , <i>Malassezia</i> , dermatofitos, <i>Paracoccidiodes brasiliensis</i> .
Alicina	<i>Allium sativum</i>	<i>Candida</i> , <i>Malassezia</i> , dermatofitos, <i>Cryptococcus</i> , <i>Aspergillus</i> .
Carvacol	<i>Thymus vulgaris</i> , <i>Thymus zygis</i>	<i>Cryptococcus neoformans</i> , <i>Saprolegnia</i> , <i>Zygorhynchu</i> .
Eucaliptol (1,8-cineol)	<i>Eucaliptus globulus</i>	<i>Candida albicans</i>
Timol	<i>Thymus vulgaris</i> , <i>Thymus zygis</i>	<i>Cryptococcus neoformans</i> , <i>Saprolegnia</i> , <i>Zygorhynchu</i> .
Zeamatina	<i>Zea mays</i>	<i>Candida albicans</i>

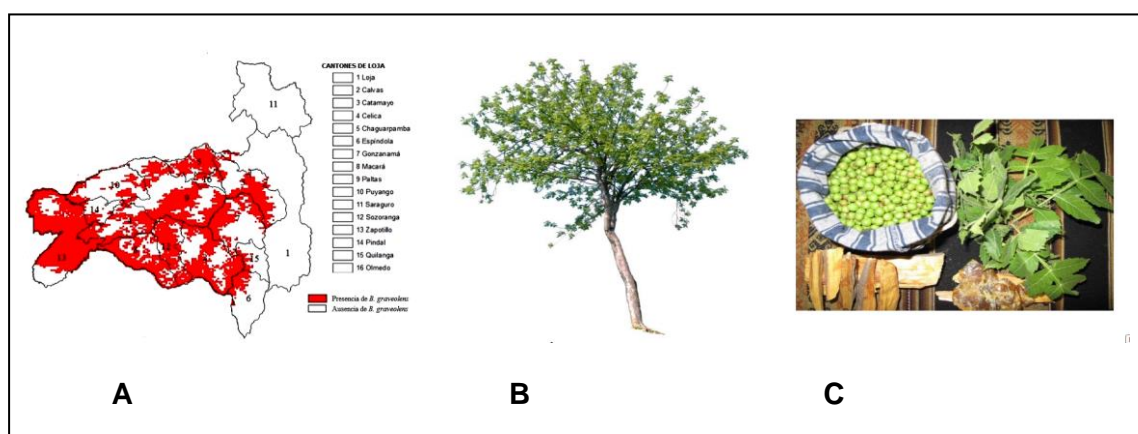
Nota. (Mesa Arango et al., 2004).

### 1.6. *Bursera graveolens*

*Bursera graveolens* o conocido como “palo santo” (Tabla 5), es una especie forestal representativa y de gran importancia, se localiza principalmente en la región sur occidental de la provincia de Loja, en los cantones de Zapotillo, Macará y Paltas (**Figura 4.A**)

**Figura 4**

*Bursera Graveolens*. A: Distribución Geográfica en la provincia de Loja. B: Aspecto general del árbol. C: Partes del árbol (frutos, hojas, astillas, resina)



Nota. Carrión, 2016

*B. graveolens* es una planta de la especie caducifolia, su crecimiento alcanza los 15 m de altura, posee una corteza lisa de color morado grisáceo. Morfológicamente sus hojas son imparipinnadas o parcialmente bipinnadas, flores blanquesinas y frutos bivalvados, subesféricos a ovoides ( Figura 4B y C) (Carrión, 2016).

**Tabla 5**

*Clasificación taxonómica de la especie Bursera graveolens*

Reino	<b>Plantae</b>
Filo	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Orden	Sapindales
Familia	Burseraceae
Género	<i>Bursera</i>
Especie	<i>Bursera graveolens</i> (Kunth) Triana & Planch
Nombre vulgar	Palo Santo

Nota. Carrión, 2016.

Ancestralmente se ha utilizado como remedio para el tratamiento y curación de dolores estomacales, reumatismo, problemas de sudoración, y se han reportado propiedades antifúngicas y antimicrobianas. Actualmente uno de los usos industriales de la especie es la extracción de aceites esenciales, que los obtienen principalmente de los frutos y utilizan los tallos secos como incienso (Arias, 2017). La especie *B. graveolens* ha sido objeto de estudio por investigadores cuyos resultados obtenidos respecto a la composición de los extractos, del aceite y la actividad farmacológica reportados no son definitivos (Manzano et al., 2009). Sin embargo, estudios realizados por (Mendez et al., 2017), validaron algunas de las propiedades antimicrobianas y antioxidantes del aceite de *B. graveolens*, obteniendo como resultado de moderada a alta actividad antimicrobiana por el método de difusión en disco contra *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*, *Clostridium perfringens*, *Escherichia coli*, *Salmonella choleraesuis* y *Candida albicans*, por lo que se confirma que el aceite esencial de *B. graveolens* demuestra propiedades antimicrobianas significativas.

Las especies pertenecientes a la familia Burseraceae producen un gran número de compuestos como, por ejemplo: oleoterpenos, diterpenos, triterpenos, compuestos fenólicos, flavonoides, cumarinas y lignanos (Caranqui, 2017). El aceite esencial de Palo Santo incluye: flavonoides, monoterpenos, triterpenos, sesquiterpenos, taninos, resinas, entre otros (Vacacela, 2012), de los que destacan:  $\alpha$ -pinene, limonene, 1,8-cineole, menthofuran, carvone, myrcene,  $\alpha$ -terpineol, mentol, entre otras (Young et al., 2007).

### **1.7. Generalidades de la piel**

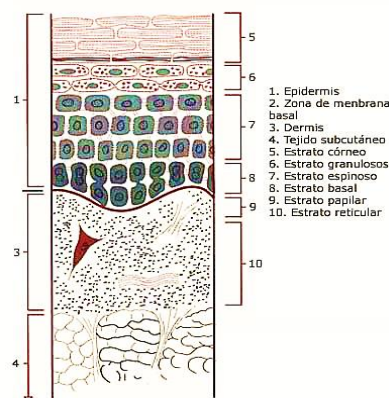
La piel es el órgano más grande del cuerpo humano, ocupa aproximadamente 1,5 a 2 m<sup>2</sup> de superficie, pesa aproximadamente 5 kg, su espesor varía entre los 0,5 mm (en los párpados) los 4 mm (en el talón), posee diversas terminaciones nerviosas

y una extensa red de neuronas que se encargan de recoger información (Méndez, 2008), protege las estructuras internas del cuerpo del ambiente externo hostil de contaminación, humedad, temperatura y radiaciones; consta de tres capas que son la epidermis, dermis y tejido subcutáneo (Sarango-Granda, 2019).

- Epidermis: es un epitelio plano poliestratificado queratinizado que se renueva continuamente, se divide en varias capas o estratos (Figura 5). Su función es proteger de amenazas ambientales potencialmente peligrosas, proporcionando barreras físicas, químicas, bioquímicas e inmunológicas (Sarango-Granda, 2019). Las capas o estratos que encontramos en la epidermis son: basal, espinoso, granuloso y córneo (Naranjo & Maldonado, 2014).
- Dermis: es una capa de tejido conectivo que incluye colágeno y fibras elásticas que se disponen de forma paralela, está muy vascularizada, proporciona soporte mecánico, flexible y compacto a la piel. Es 20-30 veces más gruesa que la epidermis y desde la epidermis se desprenden los anexos cutáneos como pelos y uñas, glándulas sebáceas y sudoríparas (López, 2016).
- Tejido subcutáneo: o también denominada hipodermis, ofrece protección contra los golpes mecánicos y aísla al cuerpo contra el calor y el frío externo, de manera genera es la región donde se almacena la energía (Palomino, 2001).

**Figura 5**

*Diferenciación epidérmica*



Nota. Palomino, 2001.

### **1.8. Ventajas de la administración por vía dérmica**

La administración de fármacos a través de la piel se emplea principalmente por su efecto local, es por ello, que se utilizan para el tratamiento de trastornos cutáneos superficiales como las enfermedades inflamatorias de piel, infecciones de piel ocasionadas por bacterias u hongos, prurito y piel seca. Las formas farmacéuticas son varias, pero entre las más tradicionales tenemos a las cremas, geles, ungüentos, lociones, entre otras (Münch et al., 2017).

Según (Kharat & Bathe, 2016) las ventajas en la administración por vía dérmica son:

- Evitar el efecto de primer paso metabólico.
- Facilidad en su administración.
- Es posible aumentar la biodisponibilidad del medicamento.
- Permite reducir la frecuencia en la dosificación.
- Practicidad en la administración de drogas a personas que por su condición médica no puedan optar por medicamentos orales.
- La dosis diaria requerida es menor que la terapia convencional.
- La liberación del fármaco es predecible y permite una duración extendida de la actividad.

### **1.9. Promotores químicos de permeación**

Los promotores de permeación son sustancias químicas que actúan sobre la permeabilidad de la piel mejorando el paso de la droga (Tabla 6). Los promotores de permeación deben ser sustancias seguras, no tóxicas, farmacológicamente y fisicoquímicamente inertes y estables, compatibles con el fármaco y resto de excipientes de la formulación, no irritantes, no alérgicos y que posean una rápida dispersión para que permita la recuperación de la función barrera de la piel (Allevato, 2007). Producen modificaciones en la estructura de los lípidos y proteínas intracelulares, además que pueden alterar el coeficiente de reparto del fármaco en la

piel, y, en algunos casos modifica indirectamente la actividad termodinámica de los vehículos de las formulaciones (Calatayud, 2013).

**Tabla 6**

*Ejemplos de promotores químicos empleados para la absorción transdérmica*

<b>Clasificación Química</b>	<b>Componente</b>
Agua	Agua
Sulfóxidos y derivados	Dimetilsulfóxido
Ureas	Urea
Pirrolidonas y derivados	N-metil-2-pirrolidona
Azone® y derivados	1-dodecilazacicloheptan- 2 ona
Tensioactivos	Lauril sulfato sódico
Terpenos	Limoneno
Alcoholes	Alcohol caprílico
Ácidos grasos	Ácido oleico

Nota. Calatayud,2013.

Mencionando al caso de los terpenos, son sustancias naturales presentes en los aceites esenciales, ambos, aceites y terpenos han sido descritos como promotores de permeación transdérmica de diversas sustancias, esto debiéndose al rompimiento del empaquetamiento de los lípidos intracelulares, incrementando la difusión del estrato córneo de fármacos hidrófilos, para los fármacos lipófilos en cambio poseen efectos disolventes que incrementan el reparto del fármaco (Aqil et al., 2007; Paduch et al., 2007; Sapra et al., 2008).

### **1.10. Geles y su clasificación**

Los geles son sistemas coloidales termodinámicamente estables, formado por al menos dos fases: una fase dispersa o discontinua y una fase dispersante o continúa. Estos se forman debido a las macromoléculas que poseen, tales como: proteínas, polímeros o polisacáridos que se dispersan en un líquido o agente dispersante, aumentando de volumen formando una estructura tridimensional, que gracias a sus fuerzas intermoleculares permanece insoluble sin perder su forma original y cuyas propiedades reológicas y texturales características, dependen

exclusivamente de la interacción que se produce entre el sólido y el líquido. Desde el punto de vista farmacéutico, los geles son formas farmacéuticas generalmente transparentes, de consistencia semirrígida y de fácil preparación que no contienen aceites grasos en su estructura, aumentando así la absorción de los principios activos. Por ello son utilizados para ejercer una acción tópica sobre las membranas mucosas y la piel, debido a sus propiedades son usados en muchas aplicaciones industriales como geles dentales, dermatológicos, oftalmológicos, vaginales, nasales, etc. ya que presentan una buena viscosidad, extensibilidad, estabilidad a pH ácidos, no son irritantes, no provocan sensibilización y no se licuan a temperatura corporal (Medina & Coloma, 2015). En la (Tabla 7) encontramos un resumen de los tipos de geles según (Martínez, 2016; Medina & Coloma, 2015).

**Tabla 7**

*Tipos de geles*

<b>Criterio</b>	<b>Descripción</b>
<i>Viscosidad</i>	Geles fluidos, semisólidos y sólidos, dependen de la concentración de gelificante.
<i>Número de fases</i>	Geles monofásicos: mezcla de líquidos miscibles. Geles bifásicos: mezcla de líquidos inmiscibles.
<i>Estructura</i>	Geles elásticos: enfriamiento del sol liófilo tras previo calentamiento, propiedades de imbibición. Geles no elásticos: no tienen propiedades de imbibición.
<i>Naturaleza de la fase interna</i>	Geles inorgánicos (Ej.: magma de bentonita). Geles orgánicos naturales (Ej.: goma arábica) y sintéticos (Ej.: hidroxipropilcelulosa)
<i>Comportamiento frente al agua</i>	Geles hidrófobos: Se constituyen de parafina líquida, aceites grasos y otros compuestos lipídicos. Poseen mejor termoestabilidad, adherencia y extensibilidad al contacto con la piel. Geles hidrofílicos o lipogeles: Se constituyen de agua y otros líquidos hidrofílicos como la glicerina, son gelificados por sustancias poliméricas, al contacto del polímero con el agua aumentan su volumen, pero mantienen su forma.

Nota.(Martínez, 2016; Medina & Coloma, 2015).

### 1.10.1. Principales componentes de los geles

Según (Cajas, 2013; LLanga, 2019) los geles se componen de:

- **Principio activo:** se conoce como una sustancia pura químicamente definida, extraída de una fuente natural o sintetizada en el laboratorio, dotada de una acción biológica que puede o no ser aprovechada por sus efectos terapéuticos.
- **Vehículo:** son sustancias de naturaleza acuosa u oleosa. Cuando la fórmula farmacéutica es líquida, el diluyente se conoce como vehículo, que puede ir o no acompañado de otros excipientes, el vehículo es el elemento imprescindible de estas formulaciones y se pueden mencionar de dos tipos:
  - *Principal:* es el que va en mayor proporción y el más utilizado es el agua destilada o desionizada en el caso de los hidrogeles, o aceite mineral en los lipogeles.
  - *Secundarios:* se utilizan para disolver algunos componentes de la formulación y contienen los grupos necesarios para la formación de puentes de hidrógeno, entre estos están: etanol, glicerina, propilenglicol, sorbitol o soluciones hidroalcohólicas.
- **Agente tensoactivo:** son compuestos químicos que al disolverse en agua o en otro disolvente disminuyen su tensión superficial y modifican las propiedades de la interfase, de este modo, la principal actividad es disminuir la tensión superficial entre dos fases y son utilizados principalmente en los lipogeles.
- **Agente neutralizante:** se incorporan en formulaciones pH dependientes. En la mayoría de los casos se trata de bases orgánicas o inorgánicas, tales como NaOH o trietanolamina. La naturaleza de la base neutralizante puede influir en ocasiones en el tacto y en la transparencia final del preparado, en líneas generales, cuanto más fuerte es la base, más rígidos y transparentes son los geles obtenidos.
- **Conservantes:** mantienen las características organolépticas y microbiológicas de las formulaciones el mayor tiempo posible. Los conservantes más usados son el metil y propil parabenos, benzoato de sodio, ácido benzoico entre otros.

- **Agentes gelificantes:** sustancias poliméricas orgánicas capaces de formar estructuras tridimensionales en medio líquido, es decir al entrar en contacto con otra, aumenta su viscosidad.

### 1.11. Control de calidad de producto terminado

El control de calidad es un conjunto de análisis que permiten precautelar que las materias primas, materiales de acondicionamiento, procesos desarrollados y producto terminado cumplan con la calidad idónea para su uso (Sarango-Granda, 2017). Entre los parámetros de evaluación más habituales tenemos los que se detallan en la **tabla 8**.

**Tabla 8**

*Parámetros de control de formulaciones en desarrollo*

Parámetro	Descripción
<i>Organolépticos</i>	Se evalúa el producto mediante la apreciación receptada a través de los órganos de los sentidos, es decir, el producto debe presentar: color, olor y textura
<i>Físicos</i>	pH, extensibilidad, viscosidad.
<i>Químicos</i>	Cualitativos: análisis gravimétricos y volumétricos Cuantitativos: HPLC, cromatografía, etc.
<i>Eficacia*</i>	Concentración Mínima Inhibitoria: mínima concentración de antimicrobiano ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) que inhibe el crecimiento visible de un microorganismo luego de 24 horas de incubación a $37^{\circ}\text{C}$ . Proporciona información acerca de posibles resistencias.

*\*Se hace referencia a evaluación de eficacia del fármaco frente a cepas microbianas.*

Nota.(Horna Quintana et al., 2005; Pérez, 2015; Rivera, 2010).

## Capítulo II

### Metodología

#### 2. Ensayos de preformulación

##### 2.1. Estudios de solubilidad

Se mezcló 4 mg de AmB (Acofarma) con 2 mL de solventes orgánicos tales como DMSO (Alfa Aesar), así como solventes comúnmente utilizados en formulaciones de uso tópico, incluyendo glicerina, propilenglicol, Lauroglicol, Labrafac, Plurol oleique, aceite de ricino. Estas mezclas se agitaron por 30 minutos a 1500 rpm utilizando un agitador magnético. Transcurrido ese tiempo, las muestras se dejaron en equilibrio por 24 horas, se centrifugaron y el sobrenadante fue disuelto con metanol para proceder a la cuantificación utilizando un espectrofotómetro UV-Visible DR 6000 (Hach, Düsseldorf, Alemania).

##### 2.2. Estudio de Compatibilidad mediante el Diseño factorial completo $2^3$

Para la selección de excipientes se llevó a cabo un diseño factorial completo  $2^3$  que requiere la realización de 8 ensayos. Para la obtención de las mezclas y su posterior análisis se utilizó el programa estadístico llamado STATGRAPHICS. Este método suministra información acerca de la compatibilidad de cada excipiente con el principio activo.

En este diseño factorial se estudiaron tres factores en dos niveles cada uno (Tabla 9).

**Tabla 9**

*Condiciones experimentales*

Factores	Niveles	
	(+)	(-)
<b>A: Polímero</b>	Carbopol	Carboximetil celulosa (CMC)
<b>B: Cosolvente</b>	Propilenglicol	Glicerina
<b>C: Conservantes</b>	Benzoato de sodio	Parabenos

Nota. Elaborado por la autora.

Mediante la matriz resultante del análisis factorial para este caso, se puede establecer la influencia de los tres factores (A, B y C) (Tabla 10).

**Tabla 10**

*Matriz del diseño factorial 2<sup>3</sup> para el desarrollo de las mezclas*

Nº Ensayo	Factores		
	A	B	C
<b>M1</b>	-	-	-
<b>M2</b>	+	-	-
<b>M3</b>	-	+	+
<b>M4</b>	+	+	-
<b>M5</b>	-	-	+
<b>M6</b>	+	-	+
<b>M7</b>	-	+	-
<b>M8</b>	+	+	+

Nota. Elaborado por la autora.

A la vez, los excipientes comunes para las 8 mezclas fueron: DMSO y agua suficiente para formar el gel deseado. Adicionalmente, se prepararon 8 mezclas más siguiendo el mismo procedimiento, pero con la incorporación de aceite de palo santo.

### 2.3. Optimización del método de elaboración

La metodología descrita a continuación fue aplicada para todas las mezclas obtenidas en el diseño factorial.

Para la elaboración del gel primero se pesaron todos los excipientes por separado.

**Para la mezcla 1:** Se colocó el polímero en un vaso de precipitación con agua destilada y se dejó en reposo por un tiempo aproximado de 30 minutos para que el polímero se hidrate.

**Para la mezcla 2:** Se añadió la AmB con el DMSO en un vaso de precipitación, se sometió a baño María por aproximadamente 10 minutos hasta que se observó disolución completa de la AmB. Se dejó enfriar y finalmente se añadió el aceite de palo santo (según corresponda) junto al humectante.

Transcurrido el tiempo de la mezcla 1 se agitó a 800 rpm en el agitador de hélice ULTRATURRAX, IKA modelo T50 DS1, luego se añadieron los conservantes y el modificador de pH y se mezcló por un tiempo aproximado de 40 minutos hasta

observar que se incorporen los excipientes. Finalmente se agregó la mezcla 2 a una temperatura de 20 °C y se mezcló por un tiempo de 10 minutos.

#### **2.4. Selección de la fórmula final para un gel de AmB y un gel de AmB más aceite de palo santo**

Todas las mezclas obtenidas en el diseño factorial fueron evaluadas en términos de pH, viscosidad, presencia de grumos o precipitados (siguiendo la metodología descrita en el apartado 3.2) en el tiempo 0 y después de las 8 semanas de almacenamiento a temperatura ambiente. Las fórmulas que presentaron cambios mínimos en estos parámetros durante el tiempo estudiado fueron seleccionadas como formulaciones finales.

#### **2.5. Caracterización fisicoquímica de las fórmulas finales**

Tanto el gel de AmB (Gel AmB) como el gel de AmB y palo santo (gel AmB+PS) fueron caracterizados física y químicamente para los siguientes parámetros:

##### **2.5.1. Aspecto**

Se evaluó visualmente, considerando si se encuentran partículas extrañas y se observa si la formulación presenta uniformidad y homogeneidad.

##### **2.5.2. Presencia de grumos**

Se aplicó una pequeña cantidad de gel en el dorso de las manos con un ligero masaje para observar la presencia o ausencia de grumos (Cruz, 2009).

##### **2.5.3. Evaluación de pH**

Calibramos el equipo OAKTON, modelo 700 con soluciones tampones de pH (4-7-10). Para evaluar el pH del gel se preparó una solución que contiene 50 mL de agua destilada y 1 g de gel. Se sumergió el electrodo en la solución y se registra el valor que indica el equipo.

#### 2.5.4. Evaluación de la viscosidad

Para medir la viscosidad del gel se utilizó el equipo marca AND modelo SV-100. Una vez encendido el equipo, la formulación fue depositada en la cubeta hasta donde indica la señal. Se puso en marcha el equipo y se anotó el resultado.

#### 2.5.5. Evaluación de la extensibilidad

Se trazó un plano cartesiano en papel milimetrado y se colocó sobre una balanza. Sobre el papel milimetrado se colocó una placa de vidrio y se añadió 1 g de gel en el centro del plano cartesiano. Posteriormente, se sobrepuso otra placa sobre la cual se agregaron diferentes pesos, registrando los radios obtenidos tras cada peso hasta notar que la formulación ya no se dispersaba. Para encontrar el resultado utilizamos la siguiente fórmula

$$A = \pi(r)^2$$

A: Área

$\pi$ : relación entre la longitud de una circunferencia y su diámetro (3.141592653...)

r: radio de las diferentes mediciones

- donde  $\pi(r)^2$  es el promedio de las mediciones

#### 2.6. Contenido de fármaco

La determinación cuantitativa de AmB en el gel, se realizó en el laboratorio de Química y Ciencias Exactas de la Universidad Técnica Particular de Loja, en el equipo de cromatografía de líquidos de alta resolución HPLC marca Bruker amazon bajo las siguientes condiciones.

- Fase móvil: acetonitrilo y ácido acético glacial 3.75% a una proporción de 65:35.
- Longitud de onda 406 nm.
- Volumen de inyección 1  $\mu$ L
- Columna: Kromasil 100 C18 (250 x 4.5 cm, 5  $\mu$ m).

### **2.6.1. Preparación de la curva de calibrado**

Se preparó la solución madre a una concentración de 1 mg/mL, para ello se pesó 25 mg de AmB con 5 mL de DMSO y se aforó con 25 mL de metanol, luego se sometió la mezcla a ultrasonido por 10 minutos. A partir de esta solución se obtuvo una curva de calibrado en un rango de concentración de 6.25 a 200 µg/mL utilizando fase móvil para las diluciones.

### **2.6.2. Preparación de las muestras**

Las muestras se prepararon a una concentración de 20 µg/mL, para ello se pesó 100 mg del gel, añadimos 2750 µL de DMF más 2250 µL de metanol se agitó constantemente con una varilla agitadora y se llevó al ultrasonido hasta observar que se disuelva bien la formulación, por último, depositamos las mezclas en viales para HPLC.

## **2.7. Eficacia**

### **2.7.1. Pre incubación bacteriana de *Cándida albicans***

Las cepas fueron donadas por el laboratorio de bioensayos del departamento de Química aplicada. Estas cepas se obtuvieron por un proceso denominado overnight en donde se incuba la bacteria a 37 °C por un tiempo de 16 -18 h en un fermentador. El crecimiento de colonias blancas puede indicar la presencia de *C. albicans*, que se confirma por ensayos de identificación.

### **2.8. Prueba de microdilución en caldo CMI**

Se pesó 1 mg de gel en un tubo eppendorf, se añadió 80 µL de DMSO y se dejó reposar por 48 horas. Pasadas las 18 horas de la pre incubación se prosiguió con el ensayo: en una cubeta se añade 10 mL de caldo saboraud y 10 µL de la bacteria esto equivale a  $1.5 \times 10^2$  UFC en la escalada de Mcfarland. Luego, se realizó el ensayo de microdilución para ello utilizamos una placa estéril de poliestireno de 96 pocillos y se añadió en todos los pocillos 100 µL de caldo saboraud, y en la fila A 80 µL de caldo más 20 µL del gel con el fin de ajustar a 200 µL, luego se tomó 100 µL de la solución

de la fila A hacia la fila B, sucesivamente realizando soluciones seriadas hasta llegar a la fila H, en la última fila se re suspende y los últimos 100 µL son descartados.

Para esterilidad: se añadió 200 µL de caldo

Para control negativo: se añadió 180 µL de caldo saboraud + 20 µL de DMSO.

Para control positivo: se añadió 180 µL + 20 µL de antibiótico anfotericina 0.25 mg/mL.

## **2.9. Estudios de estabilidad física y química de los geles de AmB con aceite de palo y sin aceite de palo santo**

Tanto el gel AmB como el gel AmB+PS fueron envasados herméticamente y almacenados por duplicado en diferentes condiciones ambientales según la normativa ICH (International Council for Harmonisation): 30°C ± 2°C (temperatura) / 65% ± 5% (humedad relativa) y 40°C ± 2 °C (temperatura) / 75% ± 5% (humedad relativa) durante 4 meses. Todas las muestras fueron evaluadas física y químicamente al tiempo 0 y después de transcurrido los 4 meses.

## **2.10. Estabilidad física**

### **2.10.1. Determinación de precipitados**

Consiste en separar sustancias sólidas suspendidas en líquidos, para lo cual se aprovecha la fuerza centrífuga que se produce en todo cuerpo al momento que gira (García & Gomez, 2000). En este trabajo, se añadió 1 g de formulación en un tubo de ensayo cónico, luego se centrifugó a un ciclo de 3000 rpm durante 30 minutos a temperatura ambiente. Transcurrido ese tiempo se evaluó visualmente la presencia o ausencia de precipitados.

### **2.10.2. Estabilidad por Termorresistencia**

Para realizar esta prueba se colocó 1 g de gel en un crisol y se sometió a una temperatura de 37° C por un tiempo de 12 horas. Transcurrido ese tiempo se evaluó visualmente si se presentaron cambios físicos (Perez, Rodriguez, Morales, Soler, & Matin, 2011).

### **2.10.3. Estabilidad química**

Las formulaciones del gel AmB y gel AmB+PS en las diferentes condiciones de estudio fueron analizadas mediante HPLC en el tiempo 0 y después de 21 días siguiendo el método descrito en el apartado 3.2.6 para determinar la estabilidad química de la formulación en las condiciones de almacenamiento señaladas.

## Capítulo III

### Resultados y Discusión

#### 3. Preformulación

##### 3.1. Solubilidad

Este fármaco es de naturaleza anfifílica, presenta un peso molecular de 924,08, pKa de 5.5, 10.0 y un log P de 2.80. En este estudio, se observó una mayor solubilidad del fármaco en el DMSO, propilenglicol y glicerina, y, por lo tanto, fueron seleccionados como cosolventes para los estudios posteriores (Tabla 11). El propilenglicol es un líquido incoloro, inodoro, que se utiliza altamente en la industria farmacéutica para la elaboración de cremas, jabones, geles. Se caracteriza por su gran capacidad humectante, buena viscosidad, gran solubilidad especialmente en agua y en compuestos como etanol, acetona, aceite de pino, además es utilizado como un gran estabilizador para surfactantes y ha demostrado ser un vehículo adecuado para solubilizar la AmB (Arevalo & Bravo, 2018). La glicerina es un líquido viscoso transparente que se utiliza principalmente como humectante y es considerado por sus características como gran disolvente. Además, presenta una buena estabilidad, posee una muy baja toxicidad y no causa irritación por lo que representa un excipiente idóneo al momento de trabajar en formulaciones cosméticas y farmacéuticas de uso tópico (Lafuente, 2017). Por su parte el DMSO, se presenta como un líquido transparente incoloro, se describe una gran capacidad de penetración en tejidos animales y vegetales por lo que se lo ha involucrado en la medicina con una amplia actividad farmacológica vasodilatadora y antiinflamatoria (Gaspar et al., 2012). Por su baja toxicidad es prácticamente inocuo cuando se aplica a través de la piel. Estudios recientes han descrito una gran efectividad antiinflamatoria administrado en forma de pomada al 50% para pacientes con procesos inflamatorios en el síndrome del dolor regional complejo. Asimismo, posee grandes propiedades disolventes que favorecen el reparto de los fármacos en la piel por lo que es el disolvente óptimo para compuestos



<b>Agua</b>	c.s.p	c.s.p	c.s.p	c.s.p	c.s.p	c.s.p	c.s.p	c.s.p
-------------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------

*Nota. Elaborado por la autora.*

### **3.3. Selección de la formulación**

Todas las mezclas obtenidas fueron caracterizadas en términos de pH, viscosidad y presencia de grumos o de precipitados. Como se puede observar en las Tablas 13 y 14, las mezclas 1, 4, 8 presentaron precipitados o formaron grumos después de las 8 semanas de almacenamiento por lo que fueron descartadas, mientras que las fórmulas 2, 5, 6 presentaron cambios significativos de pH o de viscosidad especialmente la mezcla 7 se presentó con un aspecto escurridizo.

**Tabla 13***Mezclas de gel de AmB con aceite de palo santo (Gel AmB +PS)*

<b>Mezcla</b>	<b>Tiempo 0</b>				<b>8 semanas</b>				<b>Análisis de datos</b>	
	pH	Viscosidad (Pa)	Grumos	Precipitados	pH	Viscosidad (Pa)	Grumos	Precipitados	Variación de pH	Variación de viscosidad
<b>1</b>	7	7.98	ausencia	Ausencia	8	5.19	ausencia	presencia	1	2.79
<b>2</b>	4	6.62	ausencia	Ausencia	8	5.34	ausencia	ausencia	4	1.28
<b>3</b>	6	10.45	ausencia	Ausencia	6	9.69	ausencia	ausencia	0	0.76
<b>4</b>	5	8.74	ausencia	Ausencia	8	4.7	Presencia	presencia	3	4.04
<b>5</b>	4	6.79	ausencia	Ausencia	8	5.12	ausencia	ausencia	4	1.67
<b>6</b>	7	10.53	ausencia	Ausencia	6	4.83	ausencia	presencia	1	5.7
<b>7</b>	5	3.35	ausencia	Ausencia	5	2.58	ausencia	ausencia	0	0.77
<b>8</b>	5	4.7	ausencia	Ausencia	8	5.19	ausencia	presencia	3	0.49

*Nota. Elaborado por la autora.***Tabla 14***Mezclas de gel de AmB (Gel AmB)*

<b>Mezcla</b>	<b>Tiempo 0</b>				<b>8 semanas</b>				<b>Análisis de datos</b>	
	pH	Viscosidad	Variación de Ph	Variación de viscosidad	pH	Viscosidad	Grumos	Precipitados	Variación de pH	Variación de viscosidad
<b>1</b>	6	6.57	Ausencia	Ausencia	5	3.11	ausencia	presencia	1	3,46
<b>2</b>	6	5.1	Ausencia	Ausencia	7	3.66	ausencia	ausencia	4	1,44
<b>3</b>	6	9.45	Ausencia	Ausencia	6	8.41	ausencia	ausencia	0	1,04
<b>4</b>	6	6.87	Ausencia	Ausencia	6	4.7	ausencia	presencia	3	2,17
<b>5</b>	7	6.79	Ausencia	Ausencia	7	5.12	ausencia	ausencia	4	1,67
<b>6</b>	6	4.12	Ausencia	Ausencia	6	2.25	ausencia	presencia	1	1,87
<b>7</b>	6	3.97	Ausencia	Ausencia	7	2.58	ausencia	ausencia	0	1,39
<b>8</b>	6	3.66	Ausencia	ausencia	7	2.06	ausencia	presencia	3	1,6

*Nota. Elaborado por la autora.*

### **3.4. Estudios de efectos e interacciones entre los diferentes factores del Gel AmB+PS**

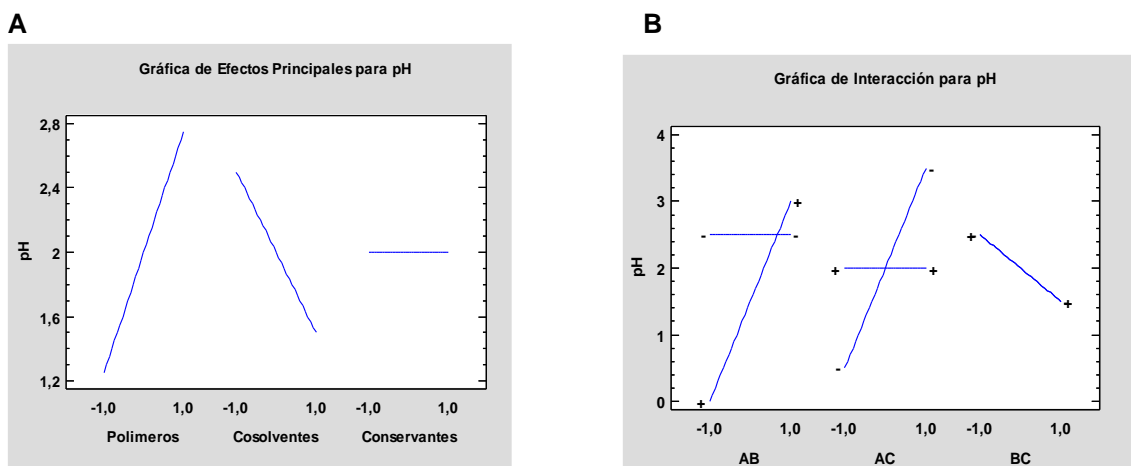
Con los resultados de la (Tabla 13), se realizó un análisis estadístico en el programa STATGRAPHICS para evaluar los efectos e interacciones entre los diferentes factores utilizando los datos de variación de pH y viscosidad después de las 8 semanas de almacenamiento de las mezclas.

Como puede observarse en la (Figura 6A), el polímero carbopol (+) y el cosolvente glicerina (-) poseen un mayor efecto en la variación de pH en comparación con la CMC (-) y propilenglicol (+), respectivamente. Mientras que, en cuanto al conservante se observa un efecto similar tanto para el Benzoato de sodio (+) como para los parabenos (-) frente a la variación de pH.

La (Figura 6B) muestra las interacciones entre los diferentes factores. Con respecto al conjunto AB que corresponde al polímero y al cosolvente existe un mayor efecto en la variación de pH cuando se mezclan el Carbopol (+) con el propilenglicol (+) y menor efecto cuando se mezclan CMC (-) y propilenglicol (+), en cuanto a las interacciones entre AC (polímero y conservante) se observa que existe un mayor efecto en la variación de pH entre Carbopol (+) con parabenos (-) y un menor efecto entre CMC (-) con los parabenos (-). Finalmente, en cuanto a la interacción BC (cosolvente y conservante) se observa que existe un mayor efecto en la variación de pH entre el cosolvente glicerina (-) y cualquiera de los conservantes, mientras que existe un menor efecto entre el propilenglicol (+) y cualquier conservante.

### Figura 6

Efectos e interacciones de los factores en la variación de pH de las formulaciones de gel AmB+PS



Nota. Elaborado por la autora.

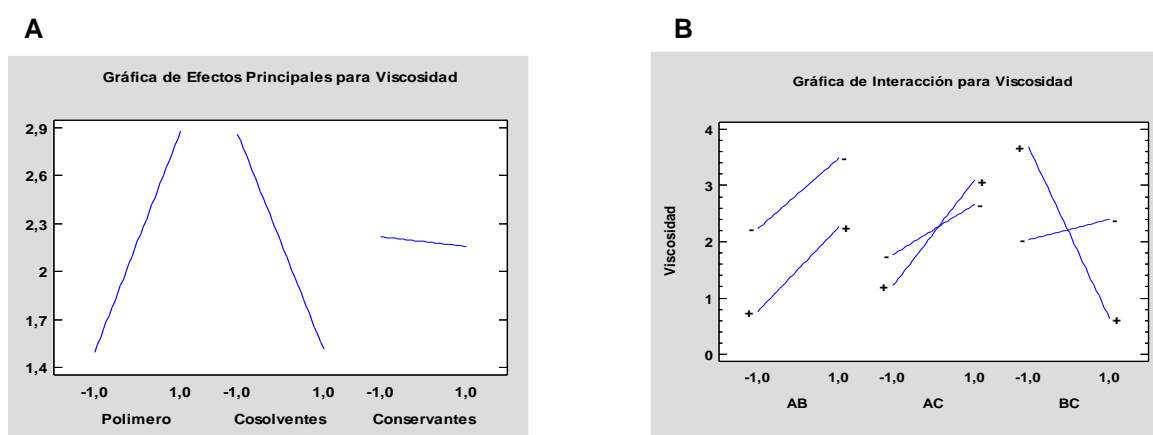
En la (Figura 7A) se detalla los efectos principales de los factores sobre la viscosidad de las formulaciones de gel de AmB + PS. Se observa que el polímero carbopol (+), el cosolvente glicerina (-) y el conservante parabenos (-) poseen un mayor efecto en la variación de viscosidad en comparación con el CMC (-), propilenglicol (+) y el benzoato de sodio (+) respectivamente.

La (Figura 7B) muestra las interacciones entre los diferentes factores de las formulaciones de gel AmB + PS. Con respecto al conjunto AB que corresponde al polímero y al cosolvente existe un mayor efecto en la variación de viscosidad cuando se mezclan el Carbopol (+) con glicerina (-) y menor efecto cuando se mezclan CMC (-) y propilenglicol (+), en cuanto a las interacciones entre AC (polímero y conservante) se observa que existe un mayor efecto en la variación de viscosidad entre Carbopol (+) y benzoato de sodio (+) y un menor efecto entre CMC (-) y benzoato de sodio (+). Finalmente, en cuanto a la interacción BC (cosolvente y conservante) se observa que existe una mayor influencia en la variación de viscosidad entre el cosolvente glicerina (-) y el conservante benzoato de sodio (+), mientras que existe un menor efecto entre el propilenglicol (+) y benzoato de sodio (+).

En conclusión, al analizar los efectos y las interacciones entre los diferentes factores de las mezclas de gel AmB+PS sobre los cambios en el pH y viscosidad se confirma que la fórmula más estable resulta de la combinación de CMC, propilenglicol y benzoato de sodio, por lo tanto, resultan ser los excipientes más idóneos para la formulación final.

### Figura 7

Efectos e interacciones de los factores en la variación de viscosidad de las formulaciones de gel AmB+PS



Nota. Elaborado por la autora.

Con los datos obtenidos a partir del diseño factorial, se escogió la mezcla que presentó mejores características físicas por lo que únicamente la mezcla 3, mostró estabilidad física durante el tiempo estudiado y en base al análisis estadístico fue la mezcla que contenía bajas interacciones, por lo tanto, fue seleccionada como fórmula final, cuya composición se detalla a continuación (Tabla 15).

**Tabla 15**

Composición de las fórmulas finales

Función	Excipientes	Gel AmB (%)	Gel AmB + PS (%)
<b>Polímero</b>	Carboximetilcelulosa	3	3
<b>Humectante - Cosolvente</b>	Propilenglicol	20	20
<b>Conservante</b>	Benzoato de Sodio	0,02	0,02
<b>Vehículo</b>	Agua	Csp.	Csp.
<b>Modificador de Ph</b>	Ácido cítrico	0,25	0,25
<b>Promotor</b>	Aceite esencial de palo santo		2

<b>API</b>	AmB	0,1	0,1
<b>Cosolvente</b>	DMSO	5%	5%

Nota. Elaborado por la autora

### 3.5. Caracterización fisicoquímica de la fórmula final

#### 3.5.1. Características organolépticas

Tanto el gel de AmB como el gel de AmB+PS presentaron un color amarillo y aspecto homogéneo sin la presencia de grumos o precipitados, consecuentemente los dos geles se presentaron estéticamente aceptables y agradables al tacto. El gel de AmB+PS presentó un ligero y agradable olor cítrico, característico del aceite esencial de palo santo.

#### 3.5.2. Análisis de pH

La evaluación del pH es un parámetro importante para evitar daños o irritación a la piel. Las dos formulaciones se encuentran con un pH de 6 tal como lo especifica la (USP33, 2010) que acepta los valores entre 5.5 a 6.5 para semisólidos de aplicación cutánea (Tabla 16). Así mismo, podemos comparar nuestro resultado con un estudio previo (Umavedi et al., 2018) acerca de la evaluación de gel poli herbal para actividad anti fúngica donde coinciden los valores de pH de su formulación considerándolo como un valor satisfactorio.

**Tabla 16**

*Caracterización física del gel de AmB y gel de AmB y aceite de palo santo*

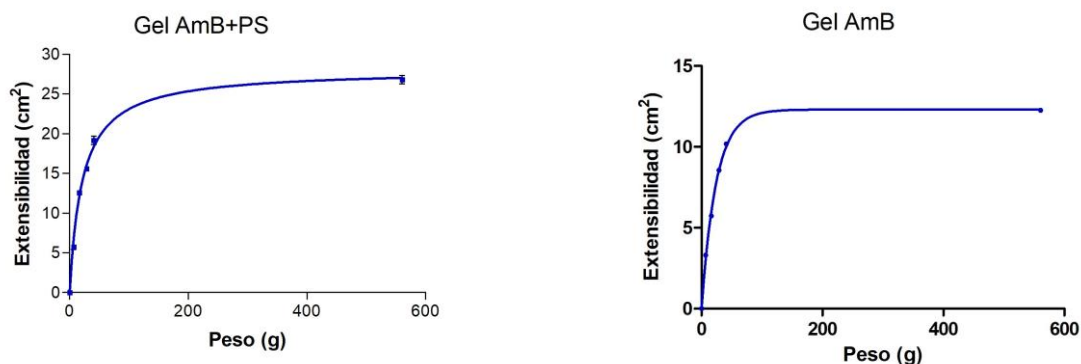
MEZCLAS	PH	VISCOSIDAD mPa	EXTENSIBILIDAD cm <sup>2</sup>
<b>GEL AMB</b>	6	8410	12,25
<b>GEL AMB+ PS</b>	6	9690	26,78

Nota. Elaborado por la autora

#### 3.5.3. Análisis de extensibilidad

Figura 8

### Análisis de Extensibilidad de las mezclas en T0 y 8 semanas



Nota. Elaborado por la autora.

En la Figura 8 observamos que existe mayor extensibilidad por parte del gel de AMB +PS que el gel de AMB. El valor de extensibilidad del gel AmB+PS se confirma con estudios previos en donde se observó resultados similares considerándose como óptimos (G. López, Ortonobes , & Garcia, 2015). De igual forma se corrobora el estudio de fórmulas farmacéuticas en piel y mucosas que vehiculicen extractos vegetales con actividad antimicrobiana de Pérez, 2018 en donde se observa una mayor extensibilidad al incorporar el extracto del género Lippia comparada con la formulación sin extracto. Un gel no debe ser ni poco extensible (muy viscoso), ni demasiado extensible (muy fluido) ya que sería muy desagradable a la hora de su aplicación e incómodo para el paciente, por lo que se requiere que se mantenga en un término medio y que con el tiempo la formulación se encuentre estable ya que la eficacia terapéutica de los gels depende de su propagación en el área afectada, considerándose un factor importante del tratamiento (Dantas et al., 2016).

#### 3.5.4. Análisis de viscosidad

La viscosidad es un parámetro importante que podría afectar a la liberación del fármaco influyendo en la velocidad de difusión del fármaco a partir de los vehículos. Los resultados de viscosidad de la formulación (Tabla 16) se observa que existe la viscosidad del GEL AMB+PS es mayor que el GEL AMB, el resultado del Gel de AMB+PS muestra valores similares a estudios previos que han reportado valores de

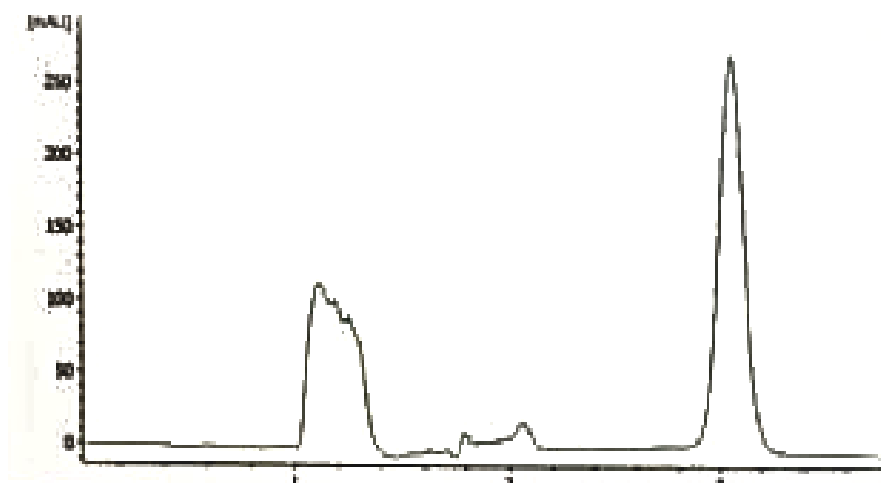
6230 mPas considerando el tipo de gel con viscosidad media estableciendo un rango entre 1000–10000 mPas que es lo que se busca en la formulación (Nardi et al., 2018). La viscosidad es un parámetro de gran importancia al momento de envasar un producto farmacéutico, ya que puede ser muy difícil de manipular si es muy viscoso o en caso de que la preparación fuese muy ligera podría ser muy escurridiza y afectaría al momento de aplicarse en la piel, sin lograr la necesidad clínica (Pei-I & Donald, 1999) .

### 3.6. Contenido de fármaco

Los resultados de HPLC mostraron la presencia de un pico en un tiempo de entre 2 a 3 minutos con una resolución satisfactoria y sin interferencias presentes por lo que convierte en un método rápido para cuantificar AmB (Figura 9). La curva de calibrado mostró linealidad en el rango de concentración de 6.5 a 200 µg/mL con un  $r^2$  de 0.9999 (Figura 10). Por lo tanto, se concluyó que el método analítico es confiable para la cuantificación de la AmB y se usó tanto para los estudios de contenido de fármaco presente en la formulación como para evaluar su estabilidad química.

**Figura 9**

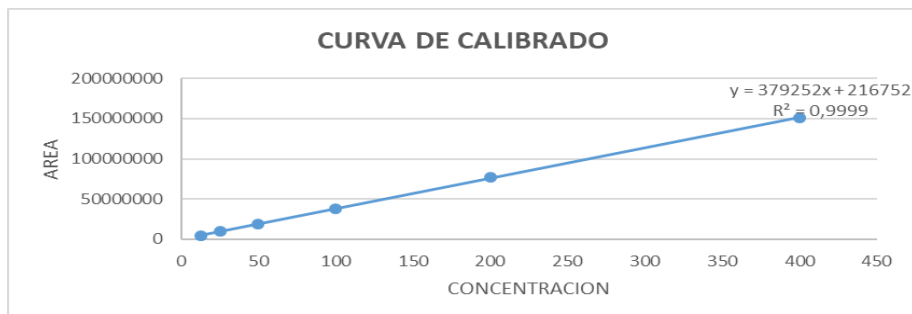
*Representación Cromatográfica HPLC de AmB*



Nota. Se detalla la curva de AmB con su peso molecular 924,08 en el minuto 3 a 500ppm

**Figura 10**

Curva de calibrado de AmB a un rango de concentración de 6.5 a 200 µg/mL



Nota. Elaborado por la autora.

En cuanto al contenido de fármaco, se evidenció un contenido del 98.5% para el gel de AmB+ PS y un 96.2% para el gel AmB. Por lo tanto, las formulaciones desarrolladas presentan la cantidad óptima ya que las normas ICH establecen que el porcentaje de principio activo debe encontrarse entre 95 -105% para que proporcione la eficacia terapéutica deseada. (Gómez, Martínez, & Martínez, 2010).

### 3.7. Evaluación de eficacia por el método de concentración mínima inhibitoria en caldo

En cuanto a la evaluación de eficacia, realizamos ensayos de microdilución en placa, obteniendo los siguientes resultados (Tabla 17).

**Tabla 17**

Concentración mínima inhibitoria para *C. albicans*

<b>Producto</b>	<b>MIC (µg/mL)</b>
<b><i>C. albicans</i></b>	<b>ATCC 10231</b>
<b>AmB</b>	<b>0.00156</b>
<b>Gel AmB</b>	<b>0.125</b>
<b>Gel AmB + PS</b>	<b>0.0625</b>
<b>Aceite de PS</b>	<b>12.5</b>
<b>Vehículos del gel</b>	<b>1000</b>

Nota. Elaborado por la autora.

Los resultados de las pruebas realizadas de la AmB muestran una gran sensibilidad frente a la cepa de *C. albicans*. Estudios realizados por Swinne, et al. 2005, hablan acerca de la susceptibilidad de la AmB que inhibe hasta el 90% del crecimiento y que la concentración mínima inhibitoria es de 0.005 µg/mL. La AmB pura usada en este estudio mostró una eficacia mayor frente al patógeno con un valor de 0.0015 µg/mL (Duarte & Herrera, 1995), (Cuenca-Estrella et al., 2002). Adicionalmente, el aceite esencial de palo santo (*B. graveolens*) mostró una capacidad para inhibir el crecimiento de *C. albicans* a una concentración de 12.5 µg/ mL. Por su parte, el vehículo no mostró un resultado relevante frente al patógeno, por lo que se concluye que los excipientes no presentan actividad frente a *C. albicans*. La incorporación del aceite de palo santo en la formulación del gel AmB+PS mejoró la eficacia frente al patógeno, exhibiendo una CMI de 0.0625 µg/mL aproximadamente la mitad de la observada para el gel AmB (0.125 µg/mL). Por lo tanto, este resultado sugiere que el uso del aceite de palo santo puede usarse como estrategia para potenciar la eficacia de la formulación o para reducir la cantidad de AmB en la fórmula y con ello reducir los efectos secundarios relacionados al fármaco, lo que la convierte en una formulación idónea para el tratamiento de candidiasis en la piel.

Estos hallazgos, incitan a realizar una investigación más profunda sobre el rol del aceite esencial de palo santo y su aplicación frente a *C. albicans*, ya que no existen estudios previos que reporten la eficacia de este aceite en el tratamiento de la candidiasis. Sin embargo, si ha sido reportada una actividad antibacterial frente a cepas Gram positivas como *S. aureus*, *B. cereus*, *L. monocytogenes*, *C. perfringens*, Gram Negativas como *E. coli*, *pseudomonas aeruginosa* (Sotelo, Figueroa, Cesare Coral, & Alegria, 2017; Vacacela, 2012) actividades que han sido atribuidas a su composición alta en de D-Limoneno, así como otros monoterpenos y sesquiterpenos, adicionalmente posee otros compuestos como lupeol y epilupeol donde han reportado que pueden utilizarse para enfermedades como sarcoma y arteroesclerosis rescatando la importancia del aceite de palo santo en el campo medicinal (Mora, 2014). La

actividad antimicrobiana de los compuestos terpénicos(limoneno) es el resultado de su difusión a través de la membrana citoplasmática ya que poseen la capacidad de alterar la permeabilidad y fluidez de la misma, afecta el transporte de iones de compuestos hidrocarbonados lo que produce una expansión y cambios en la fluidez sobre la membrana provocando la muerte del patógeno (Lujan et al., 2012), (Leyva & Martinez, 2007).

Se demuestra que la fórmula farmacéutica que contiene el aceite esencial de palo santo (*B. graveolens*) (Gel AmB+PS) posee una muy buena sensibilidad inhibiendo a *C. albicans*. comparada con la formulación solo con AmB. Sin duda la capacidad para que se produzca una gran actividad en la cepa de *C. albicans* va de la mano tanto como de la AmB como del aceite de palo santo por lo que lo convierte en una formulación idónea para el tratamiento de candidiasis en la piel.

### **3.8. Control de Calidad del producto**

#### **3.8.1. Estudios de estabilidad física y química**

Algunos factores ambientales como humedad, luz, composición, propiedades físico químicas del principio activo y excipientes intervienen con la estabilidad de las fórmulas farmacéuticas. Es importante la constante evaluación de los diferentes parámetros establecidos para obtener una fórmula magistral que cumpla con las características y el efecto terapéutico deseado (Perez et al., 2011).

#### **3.8.2. Estudios de estabilidad de las propiedades organolépticas y físicas**

En este trabajo se realizó un estudio de estabilidad de las propiedades organolépticas y físicas durante 26 días para confirmar si el gel AmB y gel AmB+PS se mantenían estables o cambiaban con el tiempo. Con respecto a los resultados de las propiedades organolépticas a los 26 días de evaluación (tabla 19) tanto las preparaciones de los geles AmB como el gel AmB+PS sometidos a diferentes temperaturas se mantuvieron de color amarillo, con el olor inicial característico, no mostraron enranciamiento,

tampoco se observaron presencia de grumos y su aspecto continuaba homogéneo, sin separación de fases.

En cuanto a los resultados de termorresistencia (Tabla 19) se observa que tanto el Gel AmB como el gel AmB+PS sometidos a diferentes temperaturas no presentan cambios transcurridas las 12 h y en cuanto a la prueba de centrifugación se observa que no se formaron precipitados ni que las fases se separaron tanto en el tiempo 0 como después de 21 días de la elaboración (Aslani, Zolfaghari, & Fereidani, 2018). La presencia de precipitados se debe a la falta de solubilidad del fármaco debido a su naturaleza lipofílica, por lo que es difícil solubilizar y solo se disuelve en solventes orgánicos, en este caso el DMSO. Sin embargo, el resultado presentado en este estudio muestra que la formulación desarrollada tiene un alto potencial de solubilización de la AmB, lo que proporciona la estabilidad demostrada.

En cuanto a la evaluación del pH la muestra sometida a diferentes temperaturas se observa que las formulaciones no presentan cambios de pH manteniéndose estables durante los 21 días de estudio. Este factor es muy importante en cuanto a la presencia de signos de irritación cutánea si estas no se mantienen entre el rango establecido USP 33, 2010 como se había mencionado antes en el apartado 4.1.1.

Los resultados de la viscosidad al tiempo 0 y durante 21 días demuestran que los geles de AMB+PS almacenados en frascos de vidrio y en frascos de vidrio ámbar tiende a aumentar que va de menor a mayor a temperatura de 25°C poseen un mínimo aumento de viscosidad seguido de las muestras sometidas a 5° y finalmente las muestras a 30° sin embargo los cambios presentados no son significativos, por lo tanto, los resultados se mantienen en los rangos establecidos anteriormente en el apartado 3.5.4. En cuanto a los análisis de viscosidad para el GEL AMB existe cierta disminución a condiciones de 25°C seguido de la temperatura a 5°C y finalmente 30°C de la viscosidad. Sin embargo, al analizar las muestras almacenadas en frascos de vidrio ámbar no existe un cambio significativo por lo que cumplen las especificaciones detalladas en el apartado 3.5.4.

En cuanto al análisis de extensibilidad muestra que este parámetro tiende a reducir con el tiempo tanto para el gel AmB como para el gel AmB+PS, pero especialmente para el gel AmB+PS posiblemente debido a la presencia del aceite esencial. Sin embargo, sus valores se consideran idóneos en cuanto a formulaciones farmacéuticas para aplicación cutánea. La presencia de cambios en la formulación, puede ser debido a ciertas interacciones entre excipientes conforme registra el handbook de excipientes farmacéuticos, Rowe, 2013, señala que CMC posee la capacidad de coagular con la presencia de compuestos como con fenoles y taninos que están presentes en el aceite de palo santo, siendo esta la responsable del cambio de viscosidad y en parte de la extensibilidad.

**Tabla 18**

*Evaluación de propiedades organolépticas y físicas al tiempo 0 y 21 días a diferentes temperaturas del Gel AmB*

Parámetros	T 0			T 21 días		
	5°C ± 2°C	25°C±2°C/ 60% ±5%	30±2°C/ 65±5%	5°C ± 2°C	25°C±2°C/ 60% ±5%	30±2°C/ 65±5%
<b>Color</b>	Amarillo	Amarillo	Amarillo	Amarillo	Amarillo	Amarillo
<b>Olor</b>	Característico	Característico	Característico	Característico	Característico	Característico
<b>Aspecto</b>	Homogéneo	Homogéneo	Homogéneo	Homogéneo	Homogéneo	Homogéneo
<b>pH</b>	6	6	6	6	6	6
<b>Viscosidad mPa.</b>	9330	9330	9330	9350	9,340	9350
<b>Extensibilidad</b>	10.4	10.4	10.4	9.79	9.97	9.79
<b>Prueba de centrifugación</b>	Sin cambios	Sin cambios	Sin cambios	Sin cambios	Sin cambios	Sin cambios
<b>Termorresistencia</b>	Sin cambios	Sin cambios	Sin cambios	Sin cambios	Sin cambios	Sin cambios

Nota. Elaborado por la autora.

**Tabla 19**

*Evaluación de propiedades organolépticas y físicas al tiempo 0 y 21 días a diferentes temperaturas del Gel AmB + PS*

	T 0			T 21 días		
	5°C ± 2°C	25°C±2°C/ 60% ±5%	30±2°C/ 65±5%	5°C ± 2°C	25°C±2°C/ 60% ±5%	30±2°C/ 65±5%
<b>Color</b>	Amarillo	Amarillo	Amarillo	Amarillo	Amarillo	Amarillo
<b>Olor</b>	Característico	Característico	Característico	Característico	Característico	Característico
<b>Aspecto</b>	Homogéneo	Homogéneo	Homogéneo	Homogéneo	Homogéneo	Homogéneo
<b>pH</b>	6	6	6	6	6	6
<b>Viscosidad mPa.</b>	9140	9140	9140	9170	9160	9200
<b>Extensibilidad</b>	8.95	8.95	8.95	9.02	8.31	8.74
<b>Prueba de centrifugación</b>	Sin cambios	Sin cambios	Sin cambios	Sin cambios	Sin cambios	Sin cambios
<b>Termorresistencia</b>	Sin cambios	Sin cambios	Sin cambios	Sin cambios	Sin cambios	Sin cambios

Nota. Elaborado por la autora.

### 3.9. Estabilidad Química

Uno de los criterios que se deduce que afectan a la estabilidad del fármaco es que AmB es altamente fotosensible. Según el estudio realizado por Moreno, 2011 se demostró que las fórmulas almacenadas en envases de polipropileno presentaban mayores concentraciones del fármaco que las fórmulas que se conservaron en envases de vidrio. Cabe mencionar que en el presente estudio las mezclas fueron almacenadas en frascos de vidrio y en frascos de vidrio ámbar.

Para la valoración de estabilidad química se realizó un análisis de cuantificación de fármaco a las muestras almacenadas a temperatura de 30°C ± 2°C y humedad de 65% ± 5% además se realizó el análisis a una temperatura de 25°C ± 2°C humedad de 60% ± 5% y finalmente se realizó el análisis a temperatura de 5°C ± 3°C se obtuvieron los siguientes resultados (tabla 19).

Con respecto a las muestras GEL AMB muestran una menor cantidad de fármaco y demuestra que a condiciones de 30°C y 5°C existe una cantidad de fármaco degradado pese a ello sus resultados no son significativos, al analizar las muestras a

25°C se observa una mínima degradación del fármaco. Así mismo las muestras demostraron que al almacenarse en frascos de vidrio ámbar contenían una mayor cantidad de fármaco.

Al analizar las muestras GEL AMB+PS al ser sometidas a 30°C y 5°C muestran una mayor cantidad de fármaco degradado sin embargo sus resultados no son significativos y a condiciones de 25°C los resultados muestran que el GEL DE AMB+PS presenta una mínima cantidad de degradación y que al ser almacenadas en frascos de vidrio ámbar demuestran una menor cantidad de fármaco degradado. Todas las muestras al ser almacenadas en frascos de vidrio ámbar muestran que el gel se conserva mejor y existe menor cantidad de degradación de fármaco que como ya se había mencionado AMB es altamente fotosensible. Por lo tanto, las fórmulas se mantienen estables, cumplen con las normas establecidas ICH en donde se establece que el valor de degradación del principio activo debe ser menor al 10%, considerándolas idóneas para el tratamiento de la candidiasis, en nuestro caso nuestras formulas presentaron una degradación menor al 1% y que los geles de AMB+PS conserva mejor la anfotericina.

**Tabla 20**

*Estabilidad Química del gel AmB al tiempo 0 y 21 días a temperatura de 30°C ± 2°C y humedad de 65% ± 5% 25°C ± 2°C humedad de 60% ± 5% y 5°C ± 2°C*

	T 0			T 21 días			% Degradación		
	5°C ± 2°C	25°C±2 °C/60% ±5%	30±2° C/ 65±5%	5°C ± 2°C	25°C±2° C/ 60% ±5%	30±2° C/ 65±5 %	5°C ± 2°C	25°C±2 °C/60% ±5%	30±2° C/ 65±5 %
Vial transparente (%)	96.2	96.2	96.2	95.4 4	95.46	95.50	0.74	0.74	0.7
Vial ámbar (%)	96.2	96.2	96.2	95.4 8	95.56	95.51	0.72	0.64	0.69

Nota. Elaborado por la autora.

**Tabla 21**

*Estabilidad Química del gel AmB+PS al tiempo 0 y 21 días a temperatura de 30°C ± 2°C y humedad de 65% ± 5% 25°C ±2°C humedad de 60% ±5% y 5°C y 3°C*

	T 0			T 21 días			% Degradación		
	5°C ± 2°C	25°C±2 °C/60% ±5%	30±2°C / 65±5%	5°C ± 2°C	25°C±2° C/ 60% ±5%	30±2° C/ 65±5 %	5°C ± 2°C	25°C±2 °C/60% ±5%	30±2° C/ 65±5 %
Vial transparente (%)	98.5	98.5	98.5	97.8 8	97.89	97.81	0.62	0.61	0.69
Vial ámbar (%)	98.5	98.5	98.5	97.8 9	97.9	97.84	0.61	0.60	0.66

Nota. Elaborado por la autora.

## Conclusiones

El diseño factorial  $2^3$  y su posterior análisis llevado a cabo durante los estudios de preformulación nos permitió conocer la fórmula que presentó los excipientes más idóneos como son: carboximetilcelulosa como polímero, propilenglicol como cosolvente y benzoato de sodio como conservante, ya que en el transcurso del estudio mostraron menores efectos e interacciones con los demás excipientes por lo tanto fueron seleccionados para estudios de formulación, estos ensayos fueron de gran importancia para la elaboración de un producto de calidad.

Se obtuvieron dos formulaciones: Gel AmB y Gel AmB+PS, las mismas que presentaron un color amarillo, aspecto homogéneo sin la presencia de grumos, con un contenido de fármaco dentro del rango establecido (95 – 105%), así como una viscosidad, extensibilidad y pH óptimos para su aplicación tópica sobre la piel.

La concentración mínima inhibitoria nos permitió conocer que la formulación AMB+PS poseía una gran efectividad frente a *C. albicans* comparada con la formulación de AMB por lo tanto se concluye que el aceite de palo santo (*Bursera graveolens*) promueve la eficacia contra *C. albicans*, consecuentemente su incorporación en formulaciones podría ser usado como estrategia para reducir la cantidad de AmB al tiempo que se mantiene la eficacia de la formulación final y con ello evitar los efectos secundarios que la bibliografía describe para este fármaco.

Durante los estudios de estabilidad las fórmulas finales mantuvieron sus características organolépticas de color amarillo con un olor cítrico agradable de aspecto homogéneo y sin formación de grumos, así mismo sus características físicas se mantuvieron sin presentar cambios significativos que alteren a la formulación considerándola como formulación adecuada.

EL contenido de fármaco se mantuvo durante los estudios de estabilidad con una degradación menor al 10%.

### **Recomendaciones**

Para solubilizar AMB se recomienda mezclar AMB con DMSO y mantener en baño María a menos de 60° C.

Realizar estudios de compatibilidad mínimo a 2 temperaturas.

Continuar con estudios de estabilidad y poder determinar el tiempo de vida útil de la formulación.

Almacenar las muestras en frascos de vidrio ámbar..

Realizar diferentes formulaciones con el vehículo de aceite de palo santo debido a las grandes propiedades que presenta.

## Referencias

- Aizaga, S. (2017). Efecto antifúngico del Aceite Esencial de Canela (*Cinnamomum zeylanicum*) al 25%,50%,75% y 100% sobre *Candida albicans* ATCC® 10231TM [Tesis Grado, Universidad Central del Ecuador]. <http://www.dspace.uce.edu.ec/handle/25000/11016>
- Allevato, M. A. (2007). Sistemas Terapéuticos Transdérmicos. *Act Terap Dermatol*, 30, 154-166.
- Aqil, M., Ahad, A., Sultana, Y., & Ali, A. (2007). Status of terpenes as skin penetration enhancers. *Drug Discovery Today*, 12(23), 1061-1067. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2007.09.001>
- Arevalo, V., & Bravo, C. (2018). <Estudios comparativos de humectantes propilenglicol.pdf>. Universidad Politecnica Salesiana, Ecuador
- Arias, C. (2017). Desarrollo y optimización de una loción con propiedad repelente a base de aceite esencial de Palo Santo (*Bursera graveolens*). [Tesis Grado, Universidad Técnica Particular de Loja]. <http://dspace.utpl.edu.ec/handle/123456789/16955>
- Armstrong, A. W., Bukhalo, M., & Blauvelt, A. (2016). A Clinician's Guide to the Diagnosis and Treatment of Candidiasis in Patients with Psoriasis. *American Journal of Clinical Dermatology*, 17, 329-336. <https://doi.org/10.1007/s40257-016-0206-4>
- Aslani, A., Zolfaghari, B., & Fereidani, Y. (2018). Design, formulation, and evaluation of a herbal gel contains melissa, sumac, licorice, rosemary, and geranium for treatment of recurrent labial herpes infections. *Dental Research Journal*, 15, 191. doi:10.4103/1735-3327.231865
- Bohórquez-Peláez, L., & Cardona-Castro, N. (2010). Diagnóstico diferencial de las micosis superficiales con enfermedades dermatológicas. 24, 1, 37-52.
- Caballero, F., Jurado, J., & López, A. (2005). Guía de buena práctica clínica en infecciones fúngicas. *International Marketing & Communications*.
- Cajas, P. (2013). Elaboración y estudio de estabilidad de un gel de ácido salicílico utilizando como gelificante quitosano. [Tesis Grado, Universidad Central del Ecuador]. <http://www.dspace.uce.edu.ec/handle/25000/4378>
- Calatayud, M. (2013). Estudio de la absorción transdérmica de fármacos para la migraña [Tesis Doctoral]. Universidad Cardenal Herrera.
- Campozano, N. J., & Heras, V. A. (2014). Determinación de la prevalencia de dermatofitosis en los niños de la escuela de educación general básica Padre Juan Bautista Aguirre de la parroquia Miraflores de la ciudad de Cuenca [Tesis Grado, Universidad de Cuenca]. <http://dspace.ucuenca.edu.ec/handle/123456789/21010>
- Caranqui, J. (2017). Árboles y arbustos nativos potenciales para reforestación en la Sierra Central de Ecuador. *Enfoque UTE*, 8(5), 103-109. <https://doi.org/10.29019/enfoqueute.v8n5.184>
- Carretero, M. (2009). Candidiasis vulvovaginal. *OFFARM*, 28(1), 2.
- Carrión, H. (2016). Gestión y participación local para el aprovechamiento sostenible de desechos orgánicos del palo santo (*Bursera graveolens*), en el bosque seco semideciduo del sur occidente de la provincia de Loja, Ecuador [Tesis Doctoral]. Universidad de Jaén.
- Catalán, M., & Montejo, J. C. (2006). Antifúngicos sistémicos. Farmacodinamia y farmacocinética. *Revista Iberoamericana de Micología*, 23(1), 39-49. [https://doi.org/10.1016/S1130-1406\(06\)70012-2](https://doi.org/10.1016/S1130-1406(06)70012-2)
- Cechinel-Filho, V. (2012). *Plant Bioactives and Drug Discovery: Principles, Practice, and Perspectives*. John Wiley & Sons.
- Chiriboga, M., & Aguinaga, M. (2018). Infecciones fúngicas oportunistas en pacientes del hospital Carlos Andrade Marín en el periodo 2015-2017 [Tesis Grado,

- Universidad Central del Ecuador].  
<http://www.dspace.uce.edu.ec/handle/25000/15901>
- Conejo Fernández, A., Martínez Roig, A., Ramírez Balza, O., Álvez González, F., Hernández Hernández, A., Baquero Artigao, F., Alfayate Miguélez, S., Piñeiro Pérez, R., Cilleruelo Ortega, M. J., Moraga Llop, F., Lucas Gonzales, R. de, Calvo Rey, C., Conejo Fernández, A., Martínez Roig, A., Ramírez Balza, O., Álvez González, F., Hernández Hernández, A., Baquero Artigao, F., Alfayate Miguélez, S., ... Calvo Rey, C. (2016). Documento de consenso SEIP-AEPap-SEPEAP sobre la etiología, el diagnóstico y el tratamiento de las infecciones cutáneas micóticas de manejo ambulatorio. *Pediatría Atención Primaria*, 18(72), 149-172.
- Cowan, M. M. (1999). Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews*, 12(4), 564-582.
- Cuenca, S. (2012). Utilidad del exámen directo y estudio Histopatológico de Lámina Ungueal, en relación al Cultivo Micológico en el Diagnóstico de Onicomycosis. área de consulta externa del Hospital «Luis Vernaza» en el Periodo: Octubre del 2009 a Septiembre del 2010 [Tesis Grado, Universidad Católica Santiago de Guayaquil]. <http://repositorio.ucsg.edu.ec/handle/3317/173>
- Cuenca-Estrella, M., Lee-Yang, W., Ciblak, M. A., Arthington-Skaggs, B. A., Mellado, E., Warnock, D. W., & Rodriguez-Tudela, J. L. (2002). Comparative evaluation of NCCLS M27-A and EUCAST broth microdilution procedures for antifungal susceptibility testing of candida species. *Antimicrob Agents Chemother*, 46(11), 3644-3647. doi:10.1128/aac.46.11.3644-3647.2002
- Cruz, P. (2009). Elaboración y control de Calidad de un gel antimicótico de manzanilla, matico y Marco para Neo- farmaco. In (pp. 150). Riobamba
- Dalleau, S., Cateau, E., Bergès, T., Berjeaud, J.-M., & Imbert, C. (2008). In vitro activity of terpenes against Candida biofilms. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 31(6), 572-576. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2008.01.028>
- Dantas, M. G., Reis, S. A., Damasceno, C. M., Rolim, L. A., Rolim-Neto, P. J., Carvalho, F. O., . . . Almeida, J. R. (2016). Development and Evaluation of Stability of a Gel Formulation Containing the Monoterpene Borneol. *ScientificWorldJournal*, 2016, 7394685. doi:10.1155/2016/7394685
- De La Calle, N., Santa, C., & Cardona, N. (2012). Virulence factors of Candida albicans and dermatophytes in keratinized tissues infection. *CES Medicina*, 26(1), 43-55.
- Del Nogal, B., Carrabs, M., Suárez, J. A., Sandoval, N., Escalona, L., Febres, O., González, A., Martín, A., Izaguirre, Y., & Espinoza, G. (2001). Fluconazol versus Nistatina en niños con Candidiasis Orofaringea. *Archivos Venezolanos de Farmacología y Terapéutica*, 20(1), 92-98.
- Duarte, I., & Herrera, M. L. (1995). Concentración mínima inhibitoria de Anfotericina B contra Candida albicans. *Revista Médica del Hospital Nacional de Niños Dr. Carlos Sáenz Herrera*, 30, 45-50.
- DrugBank. (2005). Amphotericin B. DrugBank. <https://www.drugbank.ca/drugs/DB00681>
- Durán, J. J. T., Saldaña, H. K. R., López, R. S., Martín-Portugues, G. M., Cano, C. N., FERNÁNDEZ, F. B., AYUELA, M. A. D., Ramos, P. E. B., & SÁNCHEZ, M. del C. V. (2012). Formulaciones tópicas de anfotericina b y método de obtención (World Intellectual Property Organization Patent N.o WO2012042072A1). <https://patents.google.com/patent/WO2012042072A1/es>
- España, S., & Espinoza, T. (2019). Situación de la micosis superficial en Ecuador. [Tesis Grado, Universidad Católica Santiago de Guayaquil]. <http://repositorio.ucsg.edu.ec/handle/3317/12568>
- García, J., & Gomez, M. (2000). Gel de hidróxido de aluminio: análisis comparativo de métodos de separación sólido-líquido que se utilizan en su producción. *S.cielo*, 34 (2), 6.
- Garrote, A. (2002). Micosis cutáneas. *Offarm*, 21(8), 82-90.

- Garza, E. (2012). Caracterización taxonómica y molecular de *Candida* spp. En aislados clínicos de origen bucal en pacientes sanos y diabéticos de Nuevo León. [Tesis Máster, Universidad Autónoma de Nuevo León]. <http://eprints.uanl.mx/2868/1/1080256559.pdf>
- Gaspar, M., Bovaira, M., Carrera-Hueso, F. J., Querol, M., Jimenez, A., & Moreno, L. (2012). [Efficacy of a topical treatment protocol with dimethyl sulfoxide 50% in type 1 complex regional pain syndrome]. *Farm Hosp*, 36(5), 385-391. doi:10.1016/j.farma.2011.10.009
- Ghazi, S., Rafei, R., Osman, M., El Safadi, D., Mallat, H., Papon, N., Dabboussi, F., Bouchara, J.-P., & Hamze, M. (2019). The epidemiology of *Candida* species in the Middle East and North Africa. *Journal de Mycologie Médicale*, 29(3), 245-252. <https://doi.org/10.1016/j.mycmed.2019.07.006>
- Gimeno-Carpio, E. (2006). Tratamiento tópico de las micosis cutáneas superficiales. *Medicina Clínica*, 126, 43-46. <https://doi.org/10.1157/13097525>
- Gubelin, H., De la Parra, C., & Giesen, F. (2011). Micosis superficiales. *Revista Médica Clínica Las Condes*, 22(6), 804-812. [https://doi.org/10.1016/S0716-8640\(11\)70493-X](https://doi.org/10.1016/S0716-8640(11)70493-X)
- Guerrero, J. (2016). Identificación, susceptibilidad y distribución de especies de *Cándida* obtenidas de muestras clínicas del Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública (INSPI), de enero 2007 a abril 2016. [Tesis Grado, Pontificia Universidad Católica del Ecuador]. <http://repositorio.puce.edu.ec:80/xmlui/handle/22000/12484>
- Gómez, S. M., Martínez, J. A., & Martínez, F. (2010). Validación de un método analítico empleando cromatografía líquida de alta eficiencia para la determinación de ibuprofeno en medios biorrelevantes. *Química Nova*, 33, 1794-1799.
- Horna Quintana, G., Silva Díaz, M., Vicente Taboada, W., & Tamariz Ortiz, J. (2005). Concentración mínima inhibitoria y concentración mínima bactericida de ciprofloxacina en bacterias uropatógenas aisladas en el Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas. *Revista Medica Herediana*, 16(1), 39-45.
- Kharat, R., & Bathe, R. S. (2016). A Comprehensive Review on: Transdermal drug delivery systems. *International Journal of Biomedical and Advance Research*, 7(4), 147. <https://doi.org/10.7439/ijbar.v7i4.3131>
- Lafuente, G. (2017). Glicerol: síntesis y aplicaciones". Uned, España.
- LLanga, D. (2019). Determinación de la influencia de la concentración de quitosano en la permeabilidad transdérmica in vitro de un gel de ácido salicílico empleando celdas de difusión de Franz [Tesis Grado, Universidad Central del Ecuador]. <http://www.dspace.uce.edu.ec/handle/25000/18503>
- López, C. (2016). Desarrollo de nuevas formulaciones tópicas de anfotericina B para el tratamiento de micosis [Tesis Doctoral, Universidad Complutense de Madrid]. <https://eprints.ucm.es/38728/>
- López, G., Ortonobes, G., & Garcia, C. (2015). Ungüentos, pomadas, cremas, geles y pastas: ¿es todo lo mismo? *Form Act Pediatr Aten Prim*.
- Lujan, M., Gutierrez, F., Bventura, M., Mendoza, M., Sanchez, M., Barradas, O., & Abud, M. (2012). Composición química y actividad antimicrobiana de los aceites esenciales de hojas de *Bursera graveolens* y *Taxodium mucronatum* de Chiapas, México. *Gayana Bot.*, 7(14), 7-14.
- Maniscalchi, M. T., Lemus, D., Ledezma, E., Vivas, J., Sánchez, J., & Apitz-Castro, R. (2004). Estudio de la susceptibilidad in vitro de aislados de *Microsporum canis* al ajoene, terbinafina y griseofulvina, utilizando el método de microdilución. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, 24(1-2), 40-45.
- Manohar, V., Ingram, C., Gray, J., Talpur, N. A., Echard, B. W., Bagchi, D., & Preuss, H. G. (2001). Antifungal activities of oregano oil against *Candida albicans*. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 228(1-2), 111-117. <https://doi.org/10.1023/a:1013311632207>

- Manzano, P., Miranda, M., Gutiérrez, Y., García, G., Orellana, T., & Orellana, A. (2009). Efecto antiinflamatorio y composición química del aceite de ramas de *Bursera graveolens* Triana & Planch. (Palo santo) de Ecuador. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 14(3), 45-53.
- Martín-Aragón, S., & Benedí, J. (2004). Antimicóticos dermatológicos. *Farmacia Profesional*, 18(7), 38-49.
- Martínez, A. (2016). Desarrollo de geles de aplicación vaginal para la prevención de enfermedades de transmisión sexual [Tesis Grado, Universidad Complutense]. <http://147.96.70.122/Web/TFG/TFG/Memoria/ANA%20MARTINEZ%20RODRIGUEZ.pdf>
- Medina, S., & Coloma, D. (2015). Elaboración de un gel a base del extracto de cebolla (*Allium Cepa* L.) para aliviar y cicatrizar quemaduras de primero y segundo grado superficial [Tesis Grado, Universidad Central del Ecuador]. <http://www.dspace.uce.edu.ec/handle/25000/5983>
- Mendez, A. H. S., Cornejo, C. G. F., Coral, M. F. C., & Arnedo, M. C. A. (2017). Chemical Composition, Antimicrobial and Antioxidant Activities of the Essential Oil of *Bursera graveolens* (Burseraceae) From Perú. *Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research*, 51(3s2), s429-s436. <https://doi.org/10.5530/ijper.51.3s.62>
- Méndez, E. (2008). Elaboración, Control de Calidad y Evaluación «in vivo» de la Actividad Antimicrobiana de un Gel Obtenido del Extracto Alcaloidal del Chocho [Tesis Grado, Escuela Superior Politécnica de Chimborazo]. <http://dspace.esPOCH.edu.ec/handle/123456789/208>
- Mesa Arango, A. C., Bueno Sánchez, J. G., & Betancur Galvis, L. A. (2004). Productos naturales con actividad antimicótica. *Rev Esp Quimioterap*, 17(4), 325-331.
- Mora, G. (2014). Diseño de una planta para la extracción del aceite esencial de palo santo (*Bursera graveolens*) mediante destilación por arrastre de vapor. Escuela Politécnica Nacional, Quito.
- Moran, J., Olivera, J., Sanchez, O., & Handall, A. (2017). Evaluación tisular “in vivo” del dimetilsulfóxido (DMSO) en el tejido ovárico y tegumentario de la rata adulta. *Revista de Ciencias de la Salud*, 4(10), 43-56.
- Mondello, F., De Bernardis, F., Girolamo, A., Cassone, A., & Salvatore, G. (2006). In vivo activity of terpinen-4-ol, the main bioactive component of *Melaleuca alternifolia* Cheel (tea tree) oil against azole-susceptible and -resistant human pathogenic *Candida* species. *BMC Infectious Diseases*, 6, 158. <https://doi.org/10.1186/1471-2334-6-158>
- Münch, S., Wohlrab, J., & Neubert, R. H. H. (2017). Dermal and transdermal delivery of pharmaceutically relevant macromolecules. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 119, 235-242. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2017.06.019>
- Naranjo, L., & Maldonado, G. (2014). Diseño y formulación de un gel de uso tópico a base de metronidazol, para el tratamiento de acné rosácea y estudio de estabilidad por el método de Arrhenius. [Tesis Grado, Universidad Central del Ecuador]. <http://www.dspace.uce.edu.ec/handle/25000/4371>
- Nardi, A., Linares, M., Villca, F., Perez, P., Sune, J., Bachs, L., . . . Garcia, E. (2018). A new design for the review and appraisal of semi-solid dosage forms: Semi-solid Control Diagram (SSCD). *PLoS One*, 13(9), e0201643. doi:10.1371/journal.pone.0201643
- Olaya, A. (2012). Dermatitis de contacto por Dimetil Sulfoxido. *ENFERMERÍA dermatológica*(16), 42-45.
- Paduch, R., Kandefor-Szerszeń, M., Trytek, M., & Fiedurek, J. (2007). Terpenes: Substances useful in human healthcare. *Archivum immunologiae et therapeuticae experimentalis*, 55, 315-327. <https://doi.org/10.1007/s00005-007-0039-1>
- Palacios, C., L, G., & Cardona, N. (2011). Candidiasis mucocutánea: espectro clínico. *Rev Asoc Colomb Dermatol.*, 19, 239-244.

- Palomino, M. (2001). Fisiología de la Piel. *Revista Peruana de Dermatología*, 11(2). [http://sisbib.unmsm.edu.pe/BVRevistas/dermatologia/v11\\_n2/fisio\\_piel.htm](http://sisbib.unmsm.edu.pe/BVRevistas/dermatologia/v11_n2/fisio_piel.htm)
- Parada, C. (2015). Evaluación de la Actividad antifúngica del extracto de las hojas de Jarilla frente a cepas de *Tiña Capitis*—Juliaca noviembre 2014 a febrero 2015 [Tesis Grado, Universidad Andina Néstor Cáceres Velásquez]. <http://repositorio.uancv.edu.pe/handle/UANCV/395>
- Pei-I, C., & Donald, D. (1999). Development and Evaluation of a Laboratory-Scale Apparatus to Simulate the Scale-Up of a Sterile Semisolid and Effects of Manufacturing Parameters on Product Viscosity. *Pharmaceutical Development and Technology*, 24(24), 9.
- Pérez, J. M. (2015). Desarrollo y aplicación de métodos para el control de calidad de principios activos en cosmética y parafarmacia [Tesis Grado]. Universidad Politécnica de Valencia.
- Perez, T., Rodriguez, Y., Morales, I., Soler, D., & Matin, N. (2011). Comportamiento reológico y extensibilidad de una formulación semisólida a partir del extracto acuoso de *Rhizophora mangle* L. *Ciencia Ed. (IMIQ)* v, 26(2), 75-79.
- Rivera, G. (2010). Elaboración de un fitopreparado antifúngico semisólido a partir del extracto fluido de la especie *Piper ecuadorensis* (matico), Loja—Ecuador [Tesis Grado]. Universidad Técnica Particular de Loja.
- Sánchez-Saldaña, L., Matos-Sánchez, R., & Sena, H. K. (2009). Infecciones micóticas superficiales. *Dermatología Peruana*, 19(3), 226-266.
- Sapra, B., Jain, S., & Tiwary, A. (2008). Sapra B, Jain S, Tiwary AK. Percutaneous permeation enhancement by terpenes: Mechanistic view. *AAPS J* 10(1): 120-32. *The AAPS journal*, 10, 120-132. <https://doi.org/10.1208/s12248-008-9012-0>
- Sarango-Granda, P. (2017). Optimización y evaluación in vitro de un fitocosmético a partir del extracto etanólico de *Piper ecuadorensis* Sodiro de la región sur del Ecuador. [Tesis Grado, Universidad Técnica Particular de Loja]. <http://dspace.utpl.edu.ec/handle/20.500.11962/21490>
- Sarango-Granda, P. (2019). Diseño, desarrollo y caracterización de una nanoemulsión cargada de un inhibidor de fosfodiesterasa 4 para el tratamiento de enfermedades inflamatorias de la piel [Tesis Máster]. Universidad de Barcelona.
- Serrano, D. (2013). Nuevas formulaciones orales, tópicas y parentales de anfotericina B con acción antifúngica y antiparasitaria [Tesis Doctoral, Universidad Complutense de Madrid]. <https://eprints.ucm.es/23010/1/T34798.pdf>
- Sosa, L. (2018). Elaboración de formulaciones nanoestructuradas de Anfotericina B para el tratamiento de la Candidiasis, Aspergilosis y Leishmaniosis cutánea [Tesis Doctoral, Universitat de Barcelona]. En TDX (Tesis Doctorals en Xarxa). <http://www.tdx.cat/handle/10803/665551>
- Sosa, L., Calpena, A. C., Silva-Abreu, M., Espinoza, L. C., Rincón, M., Bozal, N., Domenech, O., Rodríguez-Lagunas, M. J., & Clares, B. (2019). Thermoreversible Gel-Loaded Amphotericin B for the Treatment of Dermal and Vaginal Candidiasis. *Pharmaceutics*, 11(7). <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics11070312>
- Sotelo, A., Figueroa, C., Cesare Coral, M., & Alegria, C. (2017). Chemical Composition, Antimicrobial and Antioxidant Activities of the Essential Oil of *Bursera graveolens* (Burseraceae) From Perú. *Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research*, 51, s429-s436. doi:10.5530/ijper.51.3s.62
- Spampinato, C., & Leonardi, D. (2013). Candida Infections, Causes, Targets, and Resistance Mechanisms: Traditional and Alternative Antifungal Agents. *BioMed Research International*, 2013. <https://doi.org/10.1155/2013/204237>
- Stone, N. R., Bicanic, T., Salim, R., & Hope, W. (2016). Liposomal Amphotericin B (AmBisome®): A review of the pharmacokinetics, pharmacodynamics, clinical

- experience and future directions. *Drugs*, 76(4), 485-500.  
<https://doi.org/10.1007/s40265-016-0538-7>
- Swinne, D., Watelle, M., & Nolard, N. (2005). In vitro activities of voriconazole, fluconazole, itraconazole and amphotericin B against non *Candida albicans* yeast isolates. *Revista Iberoamericana De Micología*, 22(1), 24-28.  
[https://doi.org/10.1016/s1130-1406\(05\)70002-4](https://doi.org/10.1016/s1130-1406(05)70002-4)
- Tasici, A., & Cordoba, D. (2015). Evaluación de estabilidad de formulación de comprimidos. Complutense, España
- Umavedi, A., Kumari, c., Kumar, p., Hameemath , a., Divya, k., & Hisana, P. (2018). Development and Evaluation of Polyherbal Gel for Antifungal Activity. *International Journal of Current Pharmaceutical Research*, 10(5).  
doi:10.22159/ijcpr.2018v10i5.29694
- USP33. (2010). (Vol. 28). Estados Unidos de America
- Vacacela, M. (2012). Diseño y desarrollo de una loción repelente a partir del aceite esencial de la especie palo santo (*Bursera graveolens*) [Tesis Grado, Universidad Técnica Particular de Loja].  
<http://dspace.utpl.edu.ec/handle/123456789/7759>
- Verpoorte, R. (1998). Exploration of nature's chemodiversity: The role of secondary metabolites as leads in drug development. *Drug Discovery Today*, 3(5), 232-238. [https://doi.org/10.1016/S1359-6446\(97\)01167-7](https://doi.org/10.1016/S1359-6446(97)01167-7)
- Villa, J. (2001). Tecnología farmaceutica Volumen I: Aspectos fundamentales de los sistemas farmacéuticos y operaciones básicas (1.a ed., Vol. 1). Editorial Síntesis S.A.  
[https://www.academia.edu/25711281/TECNOLOGIA\\_FARMACEUTICA\\_Volumen\\_I\\_Aspectos\\_fundamentales\\_de\\_los\\_sistemas\\_farmac%C3%A9uticos\\_y\\_operaciones\\_b%C3%A1sicas](https://www.academia.edu/25711281/TECNOLOGIA_FARMACEUTICA_Volumen_I_Aspectos_fundamentales_de_los_sistemas_farmac%C3%A9uticos_y_operaciones_b%C3%A1sicas)
- Yauri, B., Chambilla, E., & Diaz, D. (2018). Actividad antimicótica del extracto etanólico de *Chenopodium ambrosioides* L. (PAICO), sobre *Candida albicans* CEPA ATCC 10231. Piura, Peru.
- Young, D. G., Chao, S., Casablanca, H., Bertrand, M.-C., & Minga, D. (2007). Essential Oil of *Bursera graveolens* (Kunth) Triana et Planch from Ecuador. *Journal of Essential Oil Research*, 19(6), 525-526.  
<https://doi.org/10.1080/10412905.2007.9699322>
- Zore, G. B., Thakre, A. D., Jadhav, S., & Karuppayil, S. M. (2011). Terpenoids inhibit *Candida albicans* growth by affecting membrane integrity and arrest of cell cycle. *Phytomedicine: International Journal of Phytotherapy and Phytopharmacology*, 18(13), 1181-1190.  
<https://doi.org/10.1016/j.phymed.2011.03.008>
- Zurita, J. (2017). Infecciones micóticas: Esas enfermedades relegadas de la salud pública [Carta al editor]. <http://revistabionatura.com/2017.02.03.2.html>