Universidad Autónoma Metropolitana- Unidad Xochimilco

NOMBRE DEL PROYECTO ESPECÍFICO

PROPUESTA Y EVALUACIÓN DE UNA FORMA FARMACÉUTICA TÓPICA ANTIMICÓTICA COMO INHIBIDOR DEL CRECIMIENTO DEL HONGO ALERGENO *ALTERNARIA* SPP

PROYECTO GENÉRICO CORRESPONDIENTE

Evaluación de productos relacionados con la salud

ETAPA

Desarrollo de métodos y técnicas analíticas para el control físico, químico, biológico y/o microbiológicos de productos relacionados con la salud

Licenciatura en Químico Farmacéutico Biólogo

Alumna: García Álvarez Aylin

Matrícula: 2192033811

Vo. Bo. del (la) o los (las) asesores (as) respecto a los contenidos académicos

Dra. Judith Castellanos Moguel

Asesor interno

Profesor Titular A, TC.

No. Económico: 28248

Dr. Javier Águila Rosas

Asesor externo

Profesor Asociado D. TC.

No. De cédula profesional: 11513982

Introducción

En el año 2009, se estimó que un 6% de la población infantil mexicana presentó enfermedades alérgicas. Las principales causas de estos padecimientos son los ácaros, pólenes y esporas fúngicas, entre las que se encuentran *Alternaria*, *Cladosporium*, *Coprinus*, *Curvularia* y *Venturia* que representan el 83% del total de estas (Terán *et al.*, 2009; Rocha-Estrada *et al*, 2013).

Alternaria spp. causa reacciones alérgicas tanto respiratorias como tópicas, por ejemplo, la dermatitis atópica (Cezar-Fontana, 2009). Los tratamientos más utilizados para tratar las alergias son el uso de medicamentos que inhiben el crecimiento de estos microorganismos. Con anterioridad se ha descrito la sensibilidad de *Cladosporium* spp. y *Alternaria* spp. al ketoconazol comercial y se determinó que este antimicótico inhibe satisfactoriamente el crecimiento de ambos hongos. Sin embargo, se conoce que el ketoconazol llega a ocasionar problemas gástricos en pacientes a los que se les receta, es por ello por lo que también se planea observar la acción del fluconazol ante dichos microorganismos, además de elaborar un emulgel con aquel principio activo que tenga un mayor halo de inhibición. Para determinar dichos efectos, se utilizan principalmente las pruebas de Kirby- Bauer y microdilución (Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica [ANMAT], 2012; Martínez- Hernández, 2013).

Planteamiento del problema

En las últimas décadas se ha observado un alza de hasta el 40% en enfermedades alérgicas en la población mundial. En México se encontró que en 2009 un 6% de la población presentó enfermedades alérgicas, considerándose ya en ese año un problema de salud pública debido a que son la principal causa de ingresos a urgencias mayormente en el área pediátrica. Generalmente las causas de estos padecimientos son la presencia de ácaros, pólenes y esporas fúngicas en el aire, estas últimas son el grupo más grande de microorganismos que se pueden encontrar en la atmósfera. Entre dichos organismos, los más comunes en México son: *Cladosporium, Alternaria, Aspergillus, Penicillium, Ulocladium*, etcétera, siendo las dos primeras las causantes de un 9.5% de sospechas alérgicas en pacientes. Además, *Alternaria*, *Cladosporium*, *Coprinus*, *Curvularia* y *Venturia* representan el 83% del total de esporas presentes (Terán *et al*., 2009; Rocha-Estrada *et al.*, 2013; González-Díaz *et al.*, 2022).

El hongo *Alternaria* esta caracterizado por ser arrastrado por diferentes vías, como el agua y el aire, aunque puede permanecer en el suelo. *Alternaria* spp es de crecimiento rápido y no solo causa reacciones alérgicas respiratorias, sino también en la piel, por ejemplo, la dermatitis atópica. La dermatitis atópica (DA) es de las patologías más comunes, que, además, causan una tendencia a desarrollar otros padecimientos como asma o rinitis alérgica, los cuales también son ocasionados por hongos atmosféricos (Cezar-Fontana, 2009; Pérez-Cotapos *et al.,* 2011; Instituto Nacional de Seguridad y Salud en el trabajo [ISNNT], 2014; Herrera-León, 2016).

En los tratamientos para la alergia, se encuentran las medidas de control ambiental y el uso de medicamentos, este último es el más común. En una investigación realizada por Martínez-Hernández en 2013, se evaluó la sensibilidad de *Cladosporium* spp y *Alternaria* spp al ketoconazol comercial, para ello, este fue diluido en dimetil sulfóxido (DMSO) y fue agregado sobre las cepas de cada hongo; debido a los resultados positivos que se obtuvieron, se determinó el uso de este medicamento para el presente proyecto. Sin embargo, se menciona que, para la administración por

vía oral de este medicamento, es necesario que se disuelva en secreciones gástricas con un pH ácido, lo cual puede ocasionar molestias en aquellos pacientes con problemas gástricos, por ello se cuentan con alternativas de uso tópico como crema de ketoconazol. Las cremas o ungüentos son mezclas multifásicas destinadas a una aplicación local, sobre la piel y mucosas, este tipo de forma farmacéutica suele dejar una mancha blanca y residuos en la zona de administración, por lo que puede ser incómodo para el paciente, para evitar esto, se plantea la elaboración de un emulgel, el cual será de uso local al igual que una crema, pero con la ventaja de no dejar residuos del medicamento. Por otro lado, ketoconazol puede generar hepatotoxicidad además de cierta resistencia antimicrobiana, por lo que se propone también evaluar como alternativa reciente de su uso, el principio activo fluconazol y que de acuerdo con la sensibilidad antimicrobiana que presenten ambos sobre el crecimiento del hongo *Alternaria* spp, se seleccionará la mejor opción como principio activo de la forma farmacéutica propuesta (Vila-Jato, 2001; ANMAT, 2012; Santiago- Téllez, 2014)

Objetivos

General: Evaluar dos principios activos con efecto antimicótico mediante las pruebas de Kirby Bauer y microdilución para determinar la inhibición del crecimiento del hongo alergeno *Alternaria* spp.

Específicos:

1. Identificar el crecimiento de *Alternaria* spp in vitro, mediante el uso del medio de cultivo papa-dextrosa para estandarizar la metodología.
2. Desarrollar una preformulación mediante una revisión bibliográfica y experimental sobre las características fisicoquímicas del antimicótico propuesto para desarrollar una alternativa de forma farmacéutica.
3. Evaluar el emulgel antimicótico mediante pruebas de Kirby-Bauer y microdilución para determinar el efecto inhibidor de crecimiento.

Antecedentes

Los hongos microscópicos son de los grupos más grandes que se encuentran en el ambiente, por lo que se pueden aislar de cualquier zona, se conoce que algunos de estos microorganismos son de utilidad en la medicina, por ejemplo, la penicilina; sin embargo, también ocasionan impactos negativos en la agricultura y en la salud de los seres humanos. Se ha descrito que las enfermedades alérgicas son un padecimiento crónico que inicia desde la infancia, entre las más comunes se encuentran la rinitis y dermatitis atópica. Una alergia es ocasionada cuando un sujeto se expone a un alérgeno, esto puede ocurrir por distintas vías como por la inhalación, el contacto o la ingestión y de acuerdo con esta categoría es la forma del tratamiento que se le dará al paciente (Garrote & Bonet, 2004; Zaragoza-Hernández, 2018).

Estudios han demostrado que los principales alérgenos reportados en niños son: *Dermatophagoides* y *Alternaria* spp. Este último es considerado uno de los más potentes alérgenos y como se mencionó con anterioridad, una consecuencia de la exposición a *Alternaria* es la dermatitis atópica (DA), esta es un proceso en el que la piel se inflama y causa un intenso prurito acompañado de resequedad en la zona. La DA es más frecuente en niños, ya que se estima que un

30% de las consultas en pediatría son por problemas dermatológicos (Soto-Angulo *et al.*, 2015; Escarrer-Jaume & Guerra-Pérez, 2019; Santana-Rodríguez *et al.*, 2019).

Cuando se quiere tratar una infección cutánea o en zonas poco accesibles como el pelo, se administran antifúngicos por vía sistémica o tópica, dentro de estos medicamentos se encuentran los azoles y los que más se utilizan son el ketoconazol (KTZ) y el fluconazol (FLZ). Estos se pueden encontrar en diferentes presentaciones, sin embargo, en la actualidad se cuentan con formas farmacéuticas innovadoras, un ejemplo es el emulgel. Se conoce que las formulaciones tópicas pueden ser de diferentes consistencia y que, además, este tipo de administración falla cuando se tratan de fármacos hidrofóbicos, pero el objetivo de un emulgel es evitar estos problemas. El emulgel es una combinación de gel y emulsión, cabe mencionar que para este caso en el que los fármacos son de naturaleza hidrofóbica, se utiliza el tipo de emulsión agua en aceite. Las principales ventajas del emulgel son: no contiene grasa, fácil de eliminar, no deja rastros o manchas, es emoliente y cosméticamente aceptable. Además, al unir ambos tipos de formas farmacéuticas, se superan las limitaciones de los geles (Garrote & Bonet, 2005; Srevidya, 2019).

Metodología

Para la elaboración de la presente investigación, se utilizaron bases de datos como: Scielo, Pubchem, Elsiever, Google académico y la BidiUAM. Ya que se realizó una revisión bibliográfica sobre el hongo alergeno *Alternaria* spp., para determinar las propiedades fisicoquímicas de ketoconazol y fluconazol, así como los fundamentos de las pruebas de Kirby-Bauer y microdilución. Por otro lado, se realizó la siembra, crecimiento y aislamiento del hongo alergeno *Alternaria* spp. obtenido de Las Ánimas. Se comprobó la sensibilidad de ketoconazol y fluconazol como principios activos y se comparó la inhibición de *Alternaria* spp. entre ambos fármacos para elegir el API con el que se realizaría la formulación. Finalmente se elaboró la preformulación del emulgel y posteriormente la formulación del fármaco elegido

Se realizó la resiembra a partir de cajas Petri que contenían diferentes hongos, dichas cajas fueron obtenidas del Predio Agrícola Las Ánimas. Para la resiembra se utilizó el medio de cultivo Sabouraud (anexo 1) y se dejó incubar a 28°C por 48 h; una vez transcurrido este tiempo, se realizó la identificación macroscópica de las colonias, en donde estas se debieron notar con textura aterciopelada, de color blanco-grisáceo o negro y al reverso negro (figura 1).

Figura 1. Morfología colonial de *Alternaria* spp.

Posteriormente se realizaron directos con la técnica de cinta pegante para observar las estructuras microscópicas de los hongos y así determinar si fueron aislados, para ello se deben encontrar conidios de color café pardo, con septos transversales y verticales (figura 2), en caso de no serlo se llevó a cabo una nueva resiembra. Este proceso fue realizado hasta que se aisló por completo a *Alternaria* spp. sin embargo, para ello fue utilizado el medio de cultivo V8 (anexo 2), esto para mantener al hongo hasta su utilización (González-Peña *et al*, 2014; Bosquez-Guerra, 2018).

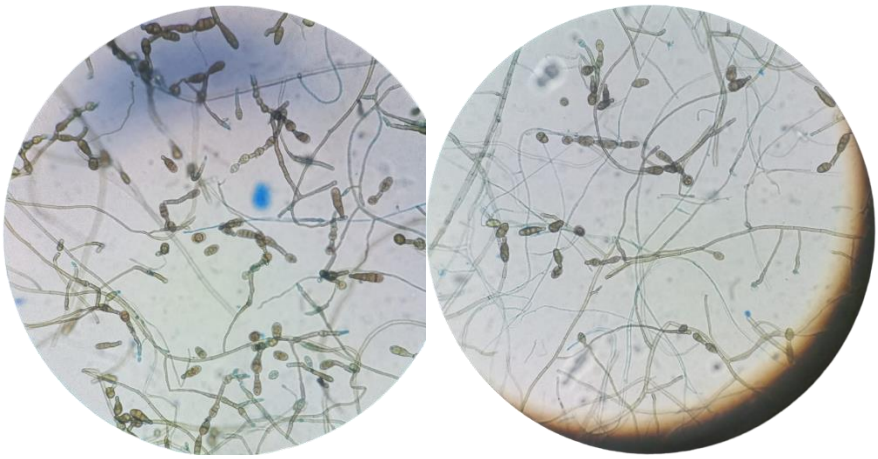

Figura 2. Estructura microscópica de *Alternaria* spp.

Una vez que se logró aislar a *Alternaria* spp., se comenzó con la elaboración de la prueba Kirby-Bauer, para la que se utilizaron 3 lotes de 9 cajas Petri con agar Sabouraud para cada uno de los fármacos, así como de tubos Falcon de 15 mL con tween al 5%, discos de papel filtro, puntillas para micropipeta (2µL), cajas Petri de vidrio y rodillo de vidrio, todo el material estéril por completo. Además, se elaboró la solución de ketoconazol y fluconazol. El método para la elaboración de ketoconazol se observa en la figura 3.

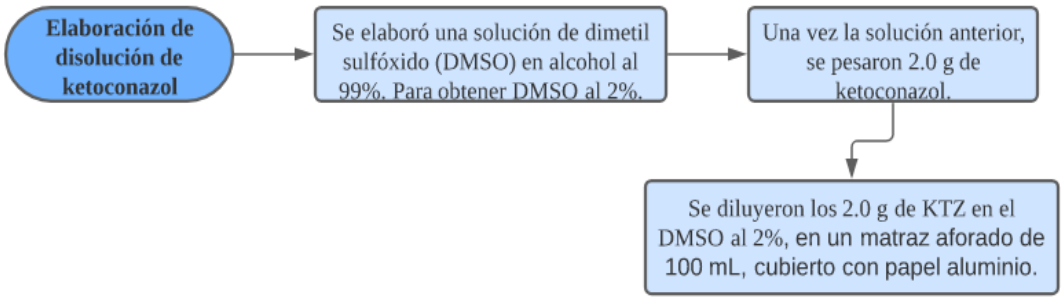

Figura 3. Diagrama sobre la elaboración de la disolución de ketoconazol.

Cabe recalcar que el matraz fue cubierto con papel aluminio para evitar la degradación del API. Por otro lado, el método para fluconazol se describe a continuación (figura 4).

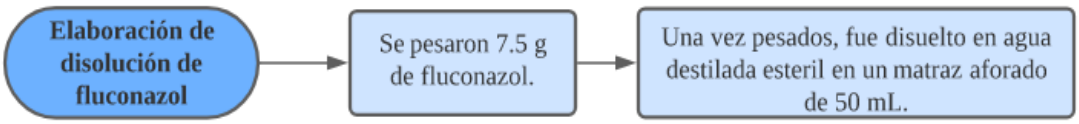

Figura 4. Elaboración de disolución de fluconazol.

De igual manera que con ketoconazol, el matraz fue cubierto con papel aluminio y etiquetado. En el caso de fluconazol, se utilizó menor volumen de disolución por la cantidad a utilizar, es decir, se optimizó la materia prima. Para la prueba de Kirby-Bauer, se necesitó realizar un conteo de conidios con una cámara de Neubauer o Hematocitómetro (figura 5).

Figura 5. Conteo de conidios con cámara de Neubauer.

La concentración que se buscó fue de 0.5 en la escala de McFarland, la cual es equivalente a $1x10^6$ células/mL. Una vez que ya se conocía la concentración de conidios, a cada caja Petri de la corrida, se añadieron 2 µL de la solución con conidios y con un rodillo de vidrio se realizó un estriado masivo para posteriormente colocar los 6 sensidiscos previamente impregnados con el fármaco a analizar, una vez listo, se incubaron a 28°C por 48 horas (figura 6). Para el caso de los testigos, se siguió el mismo procedimiento, sin embargo, los sensidiscos se encontraban impregnados de tween 80 al 5% (Martínez-Hernández, 2013).

Figura 6. Elaboración de pruebas Kirby-Bauer.

Una vez transcurrido el tiempo de incubación, se midieron los halos de inhibición que formaron los fármacos, para ello con ayuda de un marcador permanente se definió la forma y con una regla se midieron los diámetros.

Por otro lado, para la prueba de macrodilución se utilizó aquel fármaco que dio mejores resultados en Kirby-Bauer, primero se necesitó elaborar el caldo para la prueba y la solución madre, el proceso se observa en el siguiente diagrama (figura 7):

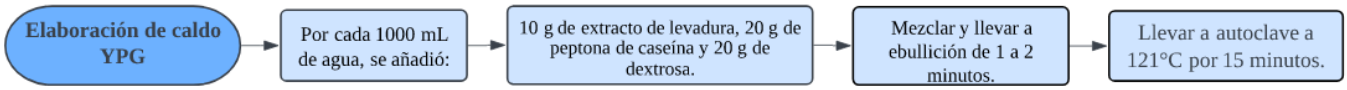

Figura 7. Elaboración de caldo YPG.

Al elaborar la solución madre de antifúngico, se consideró si era soluble en agua o no. Cuando el fármaco es insoluble se diluye con dimetilsulfóxido (DMSO) al 2%, tal y como se describe a continuación (Cantón-Lacasa *et al.*, 2007) (figura 8):

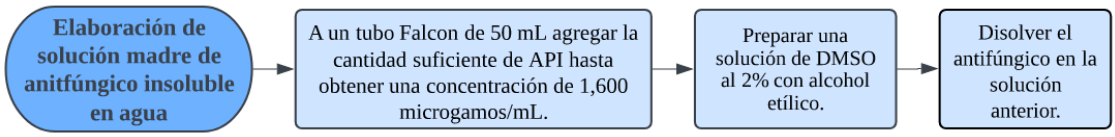

Figura 8. Elaboración de la solución madre de ketoconazol.

En dado caso de que sí sea soluble en agua, el procedimiento cambia (figura 9).

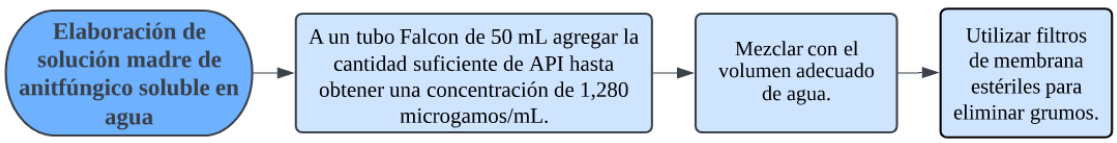

Figura 9. Elaboración de solución madre de fluconazol.

Una vez elaborada la solución madre, se realizaron las diluciones de acuerdo con la solubilidad del fármaco, por ejemplo, cuando fue con ketoconazol se elabora como en la tabla 1

Tabla 1.Diluciones de antifúngicos insolubles en agua. Obtenida de: Cantón-Lacasa *et al*, 2007.

Tabla 15a.2. Diluciones de los antifúngicos insolubles en agua.

Tubo	Concentración	Transferir	A un tubo con	Concentración resultante	Tubo
nº 2	1600 µg/ml	0,5 ml	0,5 ml de DMSO	800 µg/ml	nº 3
nº 2	1600 µg/ml	0,25 ml	0,75 ml de DMSO	400 µg/ml	nº 4
nº 2	1600 µg/ml	0,25 ml	1,75 ml de DMSO	200 µg/ml	nº 5
nº 5	200 µg/ml	0,5 ml	0,5 ml de DMSO	100 µg/ml	nº 6
nº 5	200 µg/ml	0,25 ml	0,75 ml de DMSO	50 µg/ml	nº 7
nº 5	200 µg/ml	0,25 ml	1,75 ml de DMSO	25 µg/ml	nº 8
nº 8	25 µg/ml	0,5 ml	0,5 ml de DMSO	12,5 µg/ml	nº 9
nº 8	25 µg/ml	0,25 ml	0,75 ml de DMSO	6,25 µg/ml	nº 10
nº 8	25 µg/ml	0,25 ml	1,75 ml de DMSO	3,12 µg/ml	nº 11

Cuando estuvieron listas las diluciones, se realizó lo siguiente (figura 10):

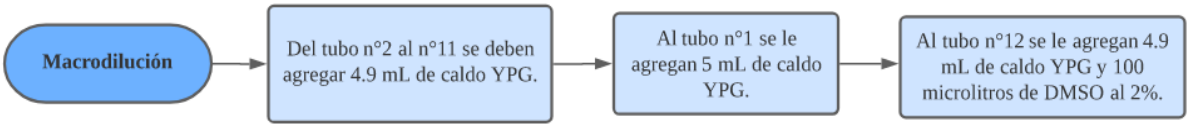

Figura 10. Método para elaborar la prueba de macrodilución.

En caso de los solubles en agua, las diluciones se realizaron de la siguiente manera (tabla 2):

Tabla 2. Diluciones de antifúngicos solubles en agua. Obtenida de: Cantón-Lacasa *et al*, 2007.

Tabla 15a.1. Diluciones de los antifúngicos solubles en agua.

Tubo	Concentración	Transferir	A un tubo con	Concentración resultante	Tubo
nº 1	1280 µg/ml	1 ml	1 ml de RPMI	640 µg/ml	nº 2
nº 2	640 µg/ml	0,5 ml	0,5 ml de RPMI	320 µg/ml	nº 3
nº 2	640 µg/ml	0,5 ml	1,5 ml de RPMI	160 µg/ml	nº 4
nº 4	160 µg/ml	0,5 ml	0,5 ml de RPMI	80 µg/ml	nº 5
nº 4	160 µg/ml	0,25 ml	0,75 ml de RPMI	40 µg/ml	nº 6
nº 4	160 µg/ml	0,25 ml	1,75 ml de RPMI	20 µg/ml	nº 7
nº 7	20 µg/ml	0,5 ml	0,5 ml de RPMI	10 µg/ml	nº 8
nº 7	20 µg/ml	0,25 ml	0,75 ml de RPMI	5 µg/ml	nº 9
nº 7	20 µg/ml	0,25 ml	1,75 ml de RPMI	2,5 µg/ml	nº 10
nº 10	2,5 µg/ml	1 ml	1 ml de RPMI	1,25 µg/ml	nº 11

Al finalizar se agregaron 4 mL de caldo YPG a cada uno de los tubos (del 1 al 12). Una vez listas las diluciones se hizo el llenado de la placa, para ello se consideró la solubilidad; cuando es insoluble en agua se lleva a cabo como se observa en el siguiente diagrama (figura 11). Cabe recalcar que para la prueba de microdilución se utiliza una placa de Elisa, además, el objetivo de dicha prueba, es obtener la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) con la que cuenta aquel fármaco que se prueba ante un microorganismo en específico.

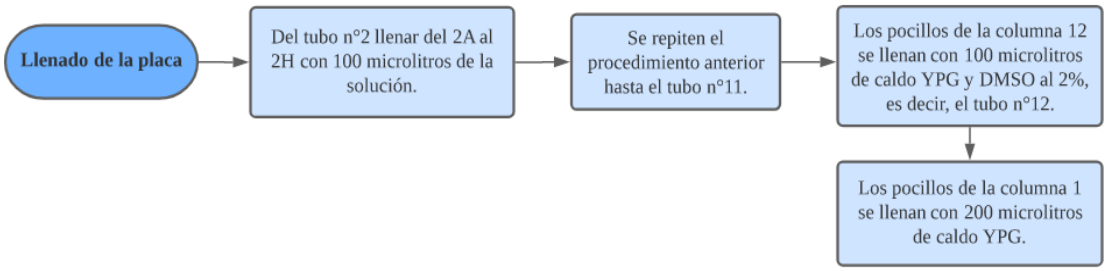

Figura 11. Método para llenar la placa, microdilución.

Por otro lado, cuando sí es soluble en agua se añaden 100 µL de cada tubo a su columna correspondiente, tal y como se observa en la figura 12.

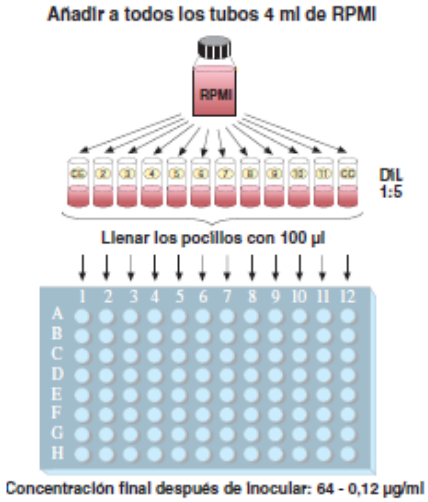

Figura 12. Llenado de placa para antifúngicos solubles en agua. Obtenida de: Cantón-Lacasa *et al*, 2007.

Para la elaboración del inoculo que se utilizó para el antifúngico insoluble en agua (ketoconazol), se suspendió una colonia del hongo de interés (*Alternaria* spp.) en solución salina hasta obtener una concentración de $1x10^6$-$5x10^6$ células/mL. Posteriormente se realizó una dilución 1:1000 con caldo YPG dando concentraciones de $1x10^3$-$5x10^3$. Esta última dilución es la que se utilizó para inocular las placas de antifúngico, la inoculación fue con 100 µL de la columna 2 a la 12. La columna 1 contenía solamente caldo con un total de 200 µL; la columna 12 también fue inoculada, pero esta solo con DMSO al 2% con caldo y no el antifúngico (Cantón-Lacasa *et al*, 2007).

La preparación del inoculo para el antifúngico soluble en agua (fluconazol) es igual que en el anterior, sin embargo, se realiza una dilución hasta obtener una concentración de $0.5x10^3$-$2.5x10^3$ (figura 13).

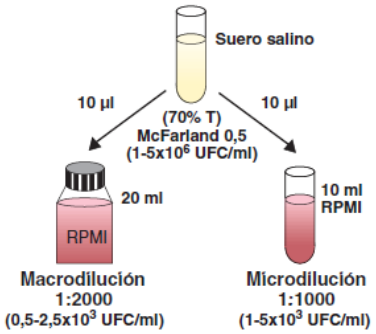

Figura 15a.5. Preparación del inóculo de levaduras.

Figura 13. Inoculo para antifúngicos solubles en agua. Obtenida de: Cantón-Lacasa *et al*, 2007.

Al finalizar la inoculación, las placas se cubrieron con parafilm y se incubaron, los resultados se observan a las 24 horas y con ellos se determina la concentración mínima inhibitoria con la que se elaborará el medicamento (emulgel).

Para la preparación del emulgel es necesario comprender que se utilizan dos formas farmacéuticas, es decir, es la unión entre una emulsión y un gel. La preparación de la emulsión dependerá de las sustancias a utilizar, pero de igual manera consta de dos fases, la acuosa y la oleosa, estás se preparan de manera individual y después se unen para así dar como resultado una emulsión. En el caso del gel, es muy común elaborarlo a base de agua destilada y carbopol (Abdullah-Akram *et al.*, 2021). Debido a que durante la elaboración de las pruebas de Kirby-Bauer se observó qué fármaco favorecía mejor la inhibición del hongo, se realizó una búsqueda de la posible formulación, la cual fue obtenida de Nailwal y col. en 2019, la formulación se observa en la tabla 3:

Tabla 3. Composición de la formulación de un emulgel de fluconazol. Obtenido de: Nailwal *et al.*, 2019.

Reactivos	Cantidad
Carbopol	1-1.5 g
Goma xantana	0-1 g
Tween 80	1-1.5 mL
Span 20	1-1.5 mL
Parafina líquida	5-7.5 mL
Etanol	2.5 mL
Propilenglicol	5 mL
Metilparabeno	0.03 g
Trietanolamina (TEA)	Gotas
Agua	c.b.p. 100 mL

La tabla anterior muestra los posibles reactivos a utilizar para elaborar un emulgel, cabe mencionar que estas fueron modificadas, ya que son para 100 mL de volumen total, sin embargo, se optimizó para obtener un total de 25 mL.

Resultados

Kirby-Bauer

Los resultados de esta prueba son más visuales, aunque se realizó un análisis estadístico de los datos mediante el método de Tukey, sin embargo, no se demostró diferencia entre ambos métodos.

1. Ketoconazol

Se realizaron tres corridas de 9 cajas para cada una y sus respectivos testigos, para KTZ se utilizó tanto el tween 80 al 5% del inoculo como el DMSO al 2% que fue el diluyente para este fármaco (figura 14, 15 y 16).

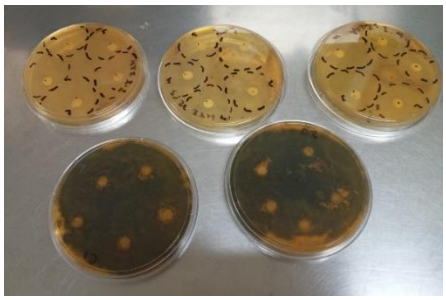

Figura 14. Primera corrida de KTZ y testigos.

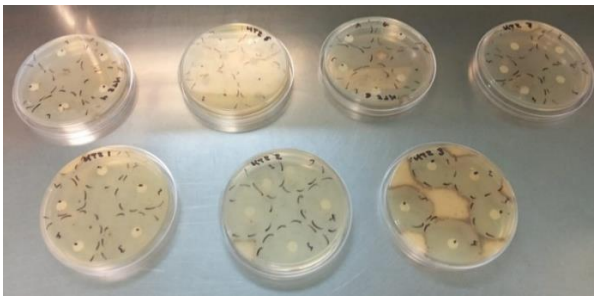

Figura 15. Segunda corrida de KTZ.

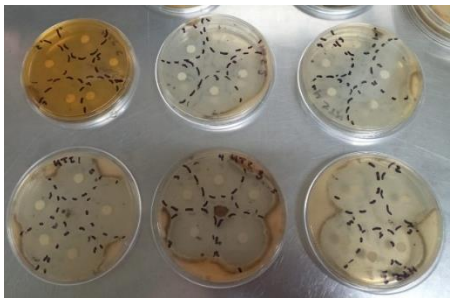

Figura 14. Tercera corrida de KTZ.

A pesar de que KTZ mostró halos de inhibición más grandes, al comparar los promedios entre los formados por la suspensión del medicamento con los testigos (principalmente DMSO al 2%), se observó que KTZ no inhibía a *Alternaria* spp. sino que el que lo hacía era el DMSO (figura 17). El control negativo (tween 80 al 5%) se puede observar en la figura 14, con la primera corrida.

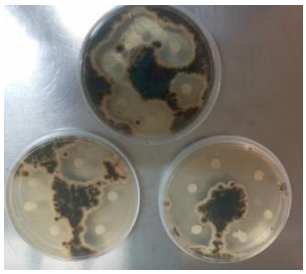

Figura 15. Control positivo para ketoconazol (DMSO).

En la figura 17, se puede observar que el DMSO dio halos de inhibición muy parecidos al KTZ, para ello se obtuvieron los promedios de las corridas del antifúngico y el diluyente para así compararlos y determinar si los resultados en las corridas de KTZ eran debidos al fármaco, finalmente se obtuvo que la inhibición se debía al DMSO y no al API, por lo que se determina que *Alternaria* spp. es resistente al primer principio activo probado.

2. Fluconazol

Para FLZ se realizaron las mismas corridas, la única diferencia es que en los testigos se utilizó agua que fue con el que se diluyó el fármaco (figura 18, 19 y 20).

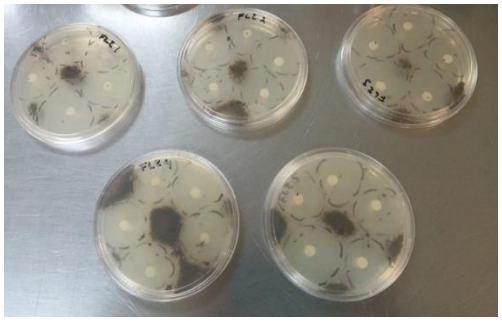

Figura 16. Primera corrida de FLZ.

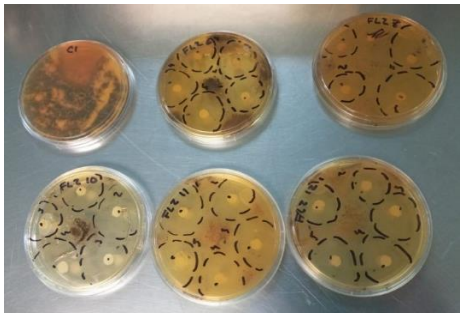

Figura 17. Segunda corrida de FLZ.

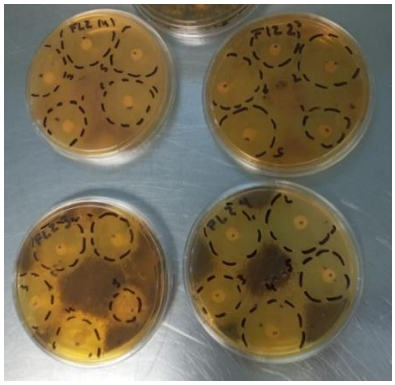

Figura 18. Tercera corrida de FLZ.

Para FLZ se utilizó agua (figura 21) por lo que esta no intervino en la inhibición del hongo alergeno, es por ello por lo que, al comparar los promedios de los diámetros de KTZ con FLZ, se determinó que este último sí inhibe el crecimiento de *Alternaria* spp. por ese motivo fue considerado para llevar a cabo la prueba de macro y microdilución y así poder determinar la CMI, la cual fue útil para la elaboración del emulgel.

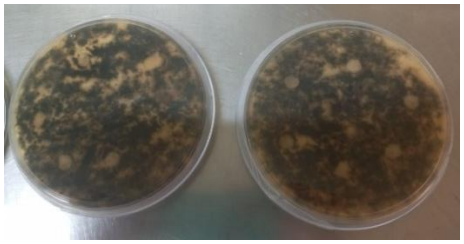

Figura 19. Testigos para fluconazol. Se utilizó agua.

Pruebas de Macrodilución y microdilución

Para la prueba de macrodilución se utilizaron tubos Falcon de 15 mL en donde se llevaron a cabo las diluciones, todo en área y con material estéril para evitar una contaminación. A partir de los tubos anteriores, se llenaron las placas Elisa para el método de microdilución, cabe mencionar que fue por triplicado (figura 22)

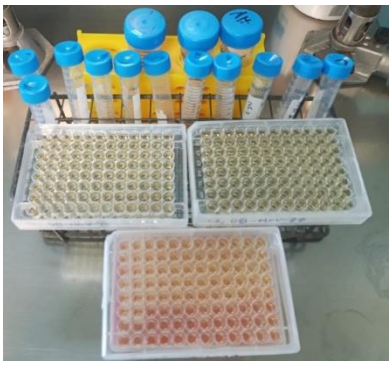

Figura 20. Materiales para la prueba de macro y microdilución.

Las tres corridas fueron realizadas el mismo día, por lo que los resultados de todas se observaron al siguiente día, dando los resultados que se muestran a continuación (figura 23, 24 y 25):

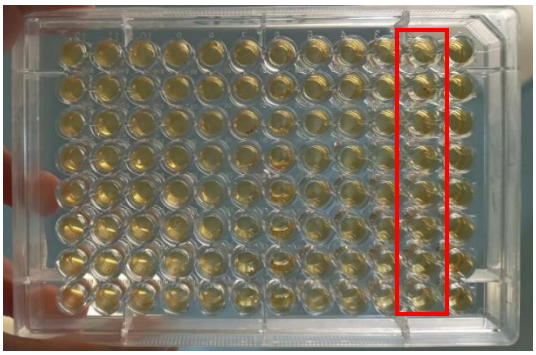

Figura 23. Corrida 1, inhibición 2A-2H.

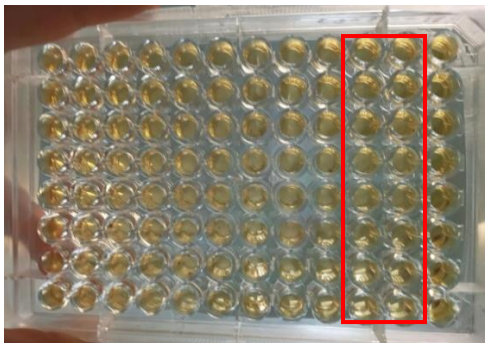

Figura 24. Corrida 2, inhibición 2A-2H y 3A-3H.

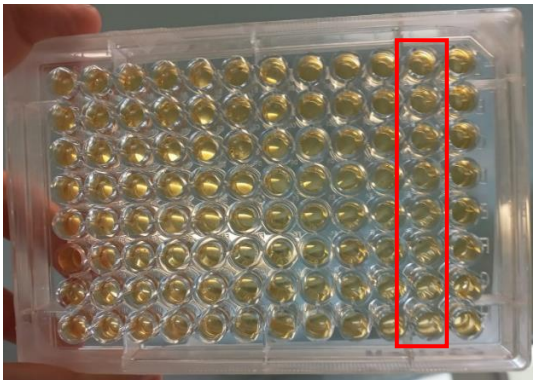

Figura 25. Corrida 3, inhibición 2A-2H

Ya que en las tres corridas se encontró en común que la inhibición se da en las columnas 2A-2H, se utilizó esa concentración (75,000 µg/mL) para elaborar el emulgel. A pesar de que en la tabla 2 se dan las concentraciones resultantes de la prueba de macrodilución para el API soluble en agua, estas se modificaron debido a que para las pruebas de Kirby-Bauer, se utilizó una concentración comercial de FLZ (150 mg), por lo que las concentraciones quedaron como se observa en la tabla 4:

Tabla 4. Concentraciones finales utilizadas para la prueba de microdilución con FLZ.

Tubo	Concentración (µg/mL)
1	150,000
2	75,000
3	37,500
4	18,750
5	9,375
6	4,687.5
7	2,343.75
8	1,171.875
9	585.9375
10	292.9687
11	146.4843

Elaboración del emulgel

La formulación que se planteo anteriormente fue modificada debido a la baja solubilidad del principio activo utilizado para elaborar el emulgel (fluconazol), para ello se realizaron distintas pruebas y así obtener una buena dilución, consistencia, olor y sensación en la piel. Para dichas pruebas, se probó diluir cierta cantidad de FLZ en cantidades variables de propilenglicol, etanol y sorbitol, también se utilizó como otra variante el calor y la agitación. Finalmente, la formulación que se siguió para obtener el emulgel se muestra en la tabla 5; cabe recalcar que la concentración de FLZ se ajustó a la cantidad que se realizó de la formulación (25 mL).

Tabla 5. Sustancias y cantidades para la elaboración de un emulgel de fluconazol.

Sustancia	Cantidad
Fluconazol	1875 mg
Carbopol	250 mg
Tween 80	0.25 mL
Span 80	0.25 mL
Aceite mineral	1.25 mL
Etanol	1.875 mL
Propilenglicol	3.75 mL
Sorbitol	1.875 mL
Metilparabeno	7.5 mg
TEA	0.001 mL
Agua	c.b.p. 25 mL

Una vez listo todo lo necesario, se preparó la base gel, para ello se calentaron 4 mL de agua y se agregó el carbopol (figura 26); se mantuvo en agitación constante a 850 rpm hasta su homogenización. De igual manera, se agregaron los 0.25 mL de Tween 80 a 4 mL de agua, se calentó a 70 °C para la fase acuosa, mientras que para la oleosa se mezcló el Span 80 y el aceite mineral, los cuales se calentaron a 70 °C. Todas los reactivos se observan en la figura 27.

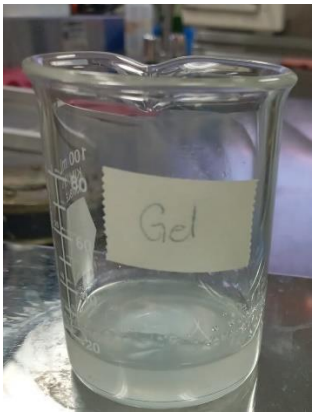

Figura 26. Base gel.

Figura 27. Sustancias utilizadas para elaboración de emulgel.

Para disolver el FLZ se mezcló el propilenglicol, sorbitol y etanol para finalmente agregar el principio activo. Una vez que todo se encontraba en el vaso de precipitado, se agitó a 850 rpm y se calentó a 45 °C por 2 min. Cuando se encontraba disuelto el API, se añadió a la fase acuosa todavía caliente y durante la agitación se agregó el metilparabeno. Posteriormente se incorporó la fase oleosa igualmente caliente y se mezcló durante 5 minutos para finalmente adicionar toda la mezcla al gel para agitar a 850 rpm por 5 minutos y una vez transcurrido el tiempo, se adjuntó la TEA para llevar al homogeneizador por 30 minutos (figura 28).

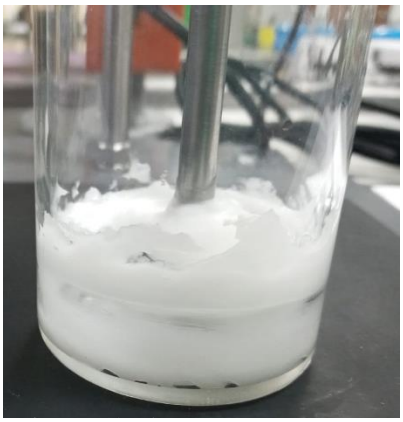

Figura 28. Homogeneización del medicamento elaborado.

Para su acondicionamiento se utilizó un frasco ámbar y uno de vidrio, esto para determinar su estabilidad (figura 29).

Figura 28. Acondicionamiento de la formulación elaborada.

Cabe recalcar que para la estabilidad solo se revisó el aspecto del emulgel (olor, color y textura) y su pH; como resultado se obtuvo que, para ambos frascos, no se observó una diferencia en su aspecto y tampoco en su pH, ya que el día de la formulación dio un pH de 6 y a los 60 días mostró el mismo resultado.

Discusión

Visualmente se puede apreciar que fluconazol mostró mejores resultados de inhibición comparados con ketoconazol en las pruebas de Kirby-Bauer, sin embargo, al momento de realizar la prueba de microdilución, se observó que la cantidad de fluconazol que se necesita para inhibir satisfactoriamente el crecimiento de *Alternaria* spp. es casi lo mismo a lo de los medicamentos comerciales (150 mg), por lo que se consideraría necesario seguir trabajando con pruebas de inhibición del crecimiento de dicho hongo, pero con diferentes antifúngicos y así determinar cuál es más eficiente. Es necesario mencionar que a pesar de que se observan buenos resultados, estadísticamente no se mostró diferencia entre ambos fármacos. El último objetivo no se cumplió debido a que no se consideró necesario realizar las pruebas de Kirby-Bauer con el emulgel formulado, ya que los componentes de este son inertes y no inhibirían adicionalmente el crecimiento del hongo, esto se puede observar en la modificación del emulgel en donde la cantidad de alcohol y algunos otros componentes se vio reducida para que no tuviese una actividad inhibitoria para *Alternaria*. Además, se observó una buena estabilidad de la formulación durante aproximadamente dos meses, sin embargo, es necesario que para poder concluir que tiene una estabilidad eficiente se tenga en observación por más tiempo.

Conclusión

Se puede concluir que *Alternaria* spp. mostró resistencia a ketoconazol, ya que la inhibición de este antifúngico ante el hongo de interés fue casi nula, mientras que fluconazol dio mejores resultados. Así mismo, se buscó la mejor preformulación para la elaboración del emulgel dicho medicamento fue elaborado solamente con aquel antifúngico que mostró mayor inhibición. Se considera necesario seguir investigando sobre aquellos hongos que generan alergias cutáneas y sus posibles tratamientos, ya que como se ha observado, no todos los medicamentos existentes en el mercado pueden proporcionar resultados efectivos.

Referencias

Abdullah-Akram, M., Ali-Khan, B., Khalid-Khan, M., Alqahtani, A., Alshahrani, S.M. & Hosny, K.M. (2021). Fabricación y caracterización de un emulgel farmacéutico polimérico co-cargado con eugenol y linalol para el tratamiento de las infecciones por *Trichophyton rubrum*. *Polímeros*, 13: 1-21.

Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica. (2012). Ketoconazol. https://www.iqb.es/cbasicas/farma/farma04/k002.htm#formula

Bosquez-Guerra, C.L. (2018). Caracterización morfológica y molecular de *Alternaria alternata* hongo fitopatógeno causante del secamientos descendente del cáliz, en frutos de *Physalis peruviana* en la Sierra centro-norte del Ecuador [Trabajo de fin de grado]. Pontificia Universidad Católica del Ecuador.

Cantón-Lacasa, E., Martín-Mazuelos, E. & Espínel-Ingroff, A. (2007). Métodos estandarizados por el CLSI para el estudio de la sensibilidad a los antifúngicos (documentos M27-A3, M38-A y M44-A). Capítulo 15a-2. Asociación Española de Micología.

Cezar-Fontana, M.B. (2009). Estudio epidemiológico de alergia a hongos y otros neumoalergenos, en estudiantes de medicina de la Universitat Autónoma de Barcelona, con relación a los niveles fúngicos ambientales [Tesis doctoral]. Universitat Autónoma de Barcelona.

Ecarrer-Jaume, M. & Guerra-Pérez, Ma. T. (2019). Dermatitis atópica. *Protocolos diagnósticos y terapéuticos en Pediatría*, 2:161-175.

Garrote, A. & Bonet, R. (2004). Alergias y antialérgicos. Causas, tipos y tratamiento. *OFFARM: farmacia y sociedad*, 23(3):82-92.

Garrote, A. & Bonet, R. (2005). Dermatomicosis. Clasificación, diagnóstico y tratamiento. *OFFARM: farmacia y sociedad*, 24(6):56-63.

González-Díaz, S. N., Lira-Quezada, C.E., Villarreal-González, R.V. y Canseco-Villarreal, J.I. (2022). Contaminación ambiental y alergia. *Revista Alergia México*, 69(1):24-30.

González-Peña, D., Costales-Menéndez, D. & Falcón-Rodríguez, A.B. (2014). Efecto de diferentes medios de cultivo sobre el desarrollo de *Phytophthora nicotianae* Breda de Haan. *Revista de Protección Vegetal*; 29(1): 33-41.

Herrera-León, F.A. (2016). Aislamiento, Caracterización Molecular y Análisis de Patogenicidad de *Alternaria* spp. sobre botones de Rosa (*Rosa* sp) y plantas de brócoli (*Brassica oleracea var. Italica*) [Tesis de fin de grado]. Universidad San Francisco De Quito USFQ.

Instituto Nacional de Seguridad y Salud en el Trabajo. (2014*). Alternaria* spp. https://www.insst.es/documents/94886/353749/Alter+spp.pdf.++a%C3%B1o+2015/5ed08d63-25cf-4d28-8a78-80f1681d7d68?version=1.1&t=1531403090536

Martínez-Hernández, M.S. (2013). Evaluación de la sensibilidad a ketoconazol de *Cladosporium* spp. *y Alternaria* spp. aislados de la atmosfera de la Ciudad de México [Trabajo de fin de grado]. Universidad Autónoma Metropolitana.

Nailwal, D., Chopra, H., Shrivastav, A. & Ahmad, Y. (2019). Formulation and Evaluation of Vegetable Oil Based Emulgel of Fluconazole. *Journal of Drug Delivery and Therapeutics*; 9(4):415-418.

Pérez-Cotapos, M.L., Zegpi, M.S. & Sáenz de Santa María, M.L. (2011). Dermatitis atópica. *Revista de medicina clínica Condes*, 22(2):197-203.

Santana-Rodríguez, C., Rivas-Juesas, C. & García-Fernández, M.E. (2019). Aeroalérgenos: pólenes, ácaros, hongos, animales y otros. Medidas de evitación. *Protocolos diagnósticos y terapéuticos en pediatría*, 2:65-85.

Santiago-Téllez, A. (2014). Determinación del efecto antimicótico de ketoconazol incorporado en cristales líquidos liotrópicos en C. albicans [Trabajo de fin de maestría, Universidad Autónoma Metropolitana].

Soto-Angulo, S., Partida-Gaytán, A., Romero-Pérez, M.S., Martínez-Viveros, A., Díaz-García, L. & Bautista- García, S.G. (2015). Análisis descriptivo de la sensibilización a alérgenos en una población pediátrica. *Alergia, Asma e Inmunología Pediátricas*, 24(2):40-53.

Sreevidya, V.S. (2019). An Overview on Emulgel. *International Journal of Pharmaceutical and Phytopharmacological Research*; 9(1):92-97.

Vila-Jato, J.L. (2001). Tecnología farmacéutica Volumen II: Formas farmacéuticas (1ª ed.). Editorial Síntesis.

Zaragoza-Hernández, O. (2018). Los hongos microscópicos ¿Amigos o enemigos? (1ª ed.). Editorial Catarata.

Anexos

Anexo 1. Medio de cultivo Sabouraud

Medio de cultivo Sabouraud, para 1000 mL	
Reactivos	Cantidad (g)
Digerido pancreático de caseína	5.0
Digerido péptico de tejido animal	5.0
Dextrosa	40.0
Agar	15.0

Anexo 2. Medio de cultivo V8.

Medio de cultivo V8 para 1000 mL	
Reactivos	Cantidad (mL, g)
Jugo de verduras V8	200.0
CaCO3	2.0
Agar	15.0