



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLAN

ESTUDIO DE LA PERMEABILIDAD DE LA UÑA
HUMANA A ANTIMICOTICOS TIPO IMIDAZOL EN
PRESENCIA DE SUSTANCIAS QUERATOLITICAS.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA
P R E S E N T A :
PATRICIA TAPIA OLGUIN

ASESORES:

O.F.B. DAVID QUINTANAR GUERRERO

DR. ELISEO M. HERNANDEZ BAUMBGARTEN

CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MEX.

1984

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

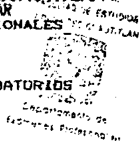
Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN
UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES



ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

DR. JAIME KELLER TORRES
DIRECTOR DE LA FES-CUAUTITLAN
P R E S E N T E .

AT'N: Ing. Rafael Rodriguez Ceballos
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la F.E.S. - C.

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la TESIS TITULADA:

Estudio de la permeabilidad de la uña humana a antimicóticos tipo imidazol en presencia de sustancias queratolíticas.

que presenta la pasante: Patricia Tapia Olquin
con número de cuenta: 8501994-2 para obtener el TITULO de:
Química Farmacéutica Bióloga

Considerando que dicha tesis reúne los requisitos necesarios para ser discutida en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

A T E N T A M E N T E .

"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Cuautitlán Izcalli, Edo. de Méx., a 30 de Septiembre de 1994

PRESIDENTE Q.F.B. Maricela Noé Martínez

VOCAL Q.F.B. Guadalupe Rebollar Barrera

SECRETARIO Q.F.B. Efrén Hernández Baltazar

PRIMER SUPLENTE Q.F.B. Lidia Rangel Trujano

SEGUNDO SUPLENTE Q.F.B. Rafael García Villalobos

DEDICATORIAS

A Dios, porque tu Amor me permite salir siempre adelante, que tú *LUZ* nos ilumine eternamente.

A mis padres: Guillermo y Ma. Guadalupe, a mis hermanos: Memo, Ale, Gaby, Kary, Osvaldo, por su apoyo y confianza. Esta alegría es suya. Los quiero y siempre estarán en mí.

A Gustavo A. y J. Alejandro, que esto sea un pequeño ejemplo de lo que se puede alcanzar en la vida, los quiero.

A mis amigos con los que he recorrido parte de mi vida y han compartido a mi lado el nacimiento de *ésta dicha*. Los adoro.

RECONOCIMIENTOS

A mis asesores: Q. F. B. David Quintana J. y Dr. Eliseo M. Hernandez B., por su confianza y apoyo en la realización de esta investigación.

Especial reconocimiento al Técnico Rodolfo Robles Gomez por su participación en el estudio por Microscopía Electrónica de Barrido.

A cada uno de mis sinodales por la dedicación y el enriquecimiento que le dieron a este trabajo.

A la Facultad de Estudios Superiores - Cuautitlán, y en especial a la Sección de Tecnología Farmacéutica.

Mi felicidad consiste en estar cerca de Dios

y en poner sólo en él mis esperanzas.

Sal 72, 28

INDICE

	PAGINA
LISTA DE FIGURAS.	tu
LISTA DE TABLAS.	vii
LISTA DE GRAFICOS.	xii
LISTA DE ABREVIATURAS.	xiv
I. IN RODUCCION.	2
II. OBJETIVOS.	8
III. GENERALIDADES.	
III. 1. Generalidades de la uña.	11
1.1. Definiciones.	
1.2. Estructura.	
1.3. Ultraestructura y composición.	
1.4. Aspecto físico.	
III. 2. Onicomicosis.	19
2.1. Definiciones.	

2.2. Características clínicas.	
2.3. Onicomycosis en México.	
2.4. Incidencia en la población.	
2.5. Factores predisponentes.	
2.6. Microorganismos que la causan.	
2.7. Onicomycosis y otras enfermedades.	
III. 3. Tratamiento de onicomycosis.	35
3.1. Formas de tratamiento.	
3.2. Tratamiento sistémico.	
3.3. Tratamiento local.	
3.4. Remoción de la queratina afectada.	
3.5. Uso de queratolíticos en tratamiento local.	
3.6. Determinación de la efectividad de un fármaco antimicótico.	
III. 4. Celdas de difusión.	53
4.1. Conceptos.	
4.2. Difusión a través de una membrana.	
4.3. Clasificación de las celdas de difusión.	
4.4. Diseño de las celdas de difusión.	
III.5. Difusión a través de la uña humana.	65
IV. PARTE EXPERIMENTAL.	
INTRODUCCION.	69
IV. 1. Materiales y equipo.	71

1.1. Reactivos y principios activos.	
1.2. Equipo de difusión.	
1.3. Equipo de evaluación.	
IV. 2. Métodos.	73
2.1. Evaluaciones previas.	
2.2. Estudio por Microscopía Electrónica de Barrido para la uña humana.	
2.3. Estudio de difusión.	
V. RESULTADOS.	100
VI. DISCUSION.	121
VII. CONCLUSIONES.	134
APENDICE A	137
APENDICE B	143
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.	155

LISTA DE FIGURAS

FIGURA	PAGINA
1. Estructura de la uña humana.	13
2. Placa de la uña humana, vista lateral.	14
3. Composición química de la uña humana.	18
4. Porcentaje de onicomycosis con respecto al total de enfermedades en la uña.	20
5. Distribución porcentual de dermatofitos causantes de onicomycosis en México.	26
6. Distribución porcentual de la localización de onicomycosis en uñas de manos y pies causada por dermatofitos.	28
7. Distribución porcentual de onicomycosis causado por <i>Candida albicans</i> .	30
8. Distribución porcentual de onicomycosis en uñas de manos y pies causada por <i>Candida</i> .	31
9. Corte transversal de una celda de difusión con una membrana de grosor h , que separa a dos soluciones. Se presenta un gradiente de concentración de un difusante. C_1 es diferente de C_d y C_2 es diferente de C_r .	56

10. Se presenta un gráfico que representa la cantidad de fármaco A pasando a través de una membrana inerte como una función del tiempo. Se puede apreciar un estado estacionario y un estado no estacionario. t_L es el tiempo lag. 58
11. Espectros de máxima absorción en la región ultravioleta para Nitrato de miconazol, Ketoconazol (12 mcg/ml) e Itraconazol (10 mcg/ml), disueltos en etanol. 76
12. Espectros de máxima absorción en la región visible para Nitrato de miconazol-Verde de bromocresol (13 mcg/ml), Ketoconazol-Verde de bromocresol (13 mcg/ml) e Itraconazol-Verde de bromocresol (50mcg/ml). 77
13. Celda de difusión diseñada para nuestro estudio. A) Vista frontal y B) vista lateral. 92
14. Esquema del sistema de difusión una vez colocada la uña humana entre ambos compartimentos. 94
15. Micrografía de la uña humana sin tratar (Amplificación 4500X). 101
16. Micrografía de la superficie externa de la uña humana sin limar; A) Control, B) 102

- tratada con Urea (40%), cuatro días a 37 °C. (Amplificación 1500X).
17. Micrografía de la superficie externa de la uña humana limada; A) Control, B) tratada con Urea (40%), cuatro días a 37 °C. (Amplificación 1500X). 103
18. Micrografía de la superficie externa de la uña humana sin limar; A) Control, B) tratada con Acido salicílico (20%), cuatro días a 37 °C. (Amplificación 1500X). 104
19. Micrografía de la superficie externa de la uña humana limada; A) Control, B) tratada con Acido salicílico (20%), cuatro días a 37 °C. (Amplificación 1500X). 105
20. Micrografía de la superficie externa de la uña humana sin limar; A) Control, B) tratada con Papaina (15%), cuatro días a 37 °C. (Amplificación 1500X). 106
21. Micrografía de la superficie externa de la uña humana limada; A) Control, B) tratada con Papaina (15%), cuatro días a 37 °C. (Amplificación 1500X). 107

LISTA DE TABLAS

TABLAS	PAGINA
1. Los tres dermatofitos más frecuentemente productores de onicomicosis en México. (1957, 1972, 1989)	23
2. Solubilidad de los antimicóticos tipo imidazol en una mezcla Etanol-Agua (60:40) a 37 °C.	74
3. Relación entre Absorbancia media y Concentración para las curvas de calibración de Nitrato de miconazol, día 1 y día 2. Analista 1.	80
4. Relación entre Absorbancia media y Concentración para las curvas de calibración de Nitrato de miconazol, día 1 y día 2. Analista 2.	81
5. Relación entre Absorbancia media y Concentración para las curvas de calibración de Ketoconazol, día 1 y día 2. Analista 1.	81
6. Relación entre Absorbancia media y	82

Concentración para las curvas de calibración de Ketoconazol, día 1 y día 2. Analista 2.	
7. Relación entre Absorbancia media y Concentración para las curvas de calibración de Itraconazol, día 1 y día 2. Analista 1.	82
8. Relación entre Absorbancia media y Concentración para las curvas de calibración de Itraconazol, día 1 y día 2. Analista 2.	83
9. Orden en que se presentan las curvas de calibración para cada antimicótico, elaboradas en dos días diferentes con dos analistas.	84
10. Variación en la concentración de soluciones de tres antimicóticos en presencia de sustancias queratolíticas (37 °C), después de 15 días.	89
11. Pruebas de difusión preliminares variando las sustancias queratolíticas y los tratamientos sobre la uña humana.	96
12. Forma en que se realizaron los estudios de difusión.	97
13. Apreciación física de uñas humanas	100

- tratadas con sustancias queratolíticas, cuatro días a 37 °C, al término del tratamiento.
14. Asignación arbitraria según el efecto obtenido por las sustancias queratolíticas sobre la superficie ungueal externa sin limar y limada. 110
15. Relación entre concentración (C), cantidad (M) y el tiempo (t) para Nitrato de miconazol, obtenida para la uña humana con su superficie externa limada y tratada con papaina (15 %), 24 h, en presencia de Acido salicílico (20 %). Realizado por duplicado (37 °C). 112
16. Relación entre concentración (C), cantidad (M) y el tiempo (t) para Ketoconazol, obtenida para la uña humana con su superficie externa limada y tratada con Papaina (15 %), 24 h, en presencia de Acido salicílico (20 %), 15 días. Realizado por duplicado (37 °C). 112
17. Relación entre concentración (C), cantidad (M) y el tiempo (t) para Itraconazol obtenida para la uña humana con su superficie externa limada y tratada con 113

Papaína (15 %), 24 h, en presencia de Ácido salicílico (20 %), 15 días. Realizado una sola vez (37 °C).

18. Valores del coeficiente de permeabilidad (P), coeficiente de difusión (D), coeficiente de partición (k) y tiempo lag (t_L) de los antimicóticos tipo imidazol obtenidos experimentalmente para la uña humana con superficie externa limada, tratada con Papaína (15 %) y Ácido salicílico (20 %), a 37 °C. 118
19. Valores promedio del coeficiente de permeabilidad (P), difusión (D), tiempo lag de los antimicóticos tipo imidazol obtenidos experimentalmente para uñas humanas con superficie externa limada moderadamente, tratadas con Papaína (15 %) y Ácido salicílico (20 %), a 37 °C. 119
20. Ecuación de regresión para las curvas de calibración de los antimicóticos tipo imidazol elaboradas dos días diferentes con dos analistas. 144
21. Linealidad del sistema y análisis de varianza para las curvas de calibración de Nitrato de miconazol, en dos días 146

<i>diferentes. Analista 1 y 2.</i>	
22. Linealidad del sistema y análisis de varianza para las curvas de calibración de Ketoconazol, en dos días diferentes. Analista 1 y analista 2.	147
23. Linealidad del sistema y análisis de varianza para las curvas de calibración de Itraconazol, en dos días diferentes. Analista 1 y analista 2.	148
24. Límites de detección promedio para las curvas de calibración de los antimicóticos tipo imidazol elaboradas por dos analistas.	149
25. Sensibilidad promedio para las curvas de calibración de los antimicóticos tipo imidazol elaboradas por dos analistas.	150
26. Prueba de paralelismo para las pendientes. Analistas 1 y 2.	151
27. Prueba de paralelismo para los interceptos. Analistas 1 y 2.	152
28. Análisis de varianza para establecer la diferencia entre días y analistas.	152

LISTA DE GRAFICOS

GRAFICO	PAGINA
1. <i>Curvas de calibración para Nitrate de miconazol, elaboradas en dos días diferentes por el analista 1.</i>	85
2. <i>Curvas de calibración para Nitrate de miconazol, elaboradas en dos días diferentes por el analista 2.</i>	85
3. <i>Curvas de calibración para Ketoconazol, elaboradas en dos días diferentes por el analista 1.</i>	86
4. <i>Curvas de calibración para Ketoconazol, elaboradas en dos días diferentes por el analista 2.</i>	86
5. <i>Curvas de calibración para Itraconazol, elaboradas en dos días diferentes por el analista 1.</i>	87
6. <i>Curvas de calibración para Itraconazol, elaboradas en dos días diferentes por el analista 2.</i>	87
7. <i>Curva de la cantidad difundida (M) con</i>	115

respecto al tiempo (t) para Nitrato de miconazol, utilizando como membrana uña humana con superficie externa limada tratada con Papaina (15%), 24 h, en presencia de Acido Salicilico (20%). (Realizado a 37 ° C, por duplicado)

8. Curva de la cantidad difundida (M) con respecto al tiempo (t) para Ketoconazol, utilizando como membrana uña humana con superficie externa limada tratada con Papaina (15%), 24 h, y Acido salicilico (20%), 15 días. (Realizado a 37 °C, por duplicado). 116
9. Curva de la cantidad difundida (M) con respecto al tiempo (t) para Itraconazol, utilizando como membrana uña humana limada con superficie externa limada tratada con Papaina (15%), 24 h, y Acido salicilico (20%), 15 días. (Realizado a 37 °C, una sola vez). 117

LISTA DE ABREVIATURAS

A-Vb	Complejo antimicótico-Verde de bromocresol.
C	Concentración.
Cd	Compartimento donador.
Cr	Compartimento receptor.
C ₁	Concentración de membrana 1.
C ₂	Concentración de membrana 2.
D	Coefficiente de difusión.
Est.	Estimado.
Exp.	Experiencia.
h	Hora.
h	Grosor de la uña humana.
J	Flujo
k	Coefficiente de partición.
λ_{max}	Longitud de onda de máxima absorción.
M	Cantidad de difusante.
P	Coefficiente de permeabilidad.
p/v	Peso/volumen.
S	Area de exposición.
t	Tiempo.
t _L	Tiempo lag.

CAPITULO I

INTRODUCCION



En México existen pocos investigadores que realicen estudios micológicos, recientemente se ha reportado que sólo hay doce especialistas que pueden encargarse de investigar sobre hongos que afectan a humanos, los cuales están concentrados en hospitales. En suma muchas veces no se alcanza a identificar los hongos causantes de enfermedades en el hombre. Así mismo se maneja que del total de las enfermedades de 20 - 25 por ciento es causado por hongos.⁴⁰ Las tiñas se presentan dentro de los diez primeros lugares de consulta en México.²

Las onicomycosis son comunes, dentro de todas las enfermedades de la uña, ocupan de un 15 a 40 por ciento aproximadamente.^{13,16}

Ahora bien la presencia de onicomycosis, enfermedad producida por hongos sobre las uñas de manos y pies, es alta, sin embargo, pocos son los estudios que se han realizado para determinar con mayor aproximación su incidencia. Por otra parte, a pesar de su presencia en la población no se le confiere importancia debido a que no se presentan molestias como dolor, comezón, etc., aunque cuando todas las uñas se han infectado, que es cuando se agrava la enfermedad, entonces consideran pertinente ir a consultar a un médico o especialista.

Existen preparados farmacéuticos disponibles comercialmente, tanto para un tratamiento sistémico como para un tratamiento tópico e inclusive una combinación de ambos, pero se tiene la desventaja de que son muy largos (más de un año), la presencia de efectos adversos, cuando se usa una vía oral, es inevitable y solo se puede eliminar suprimiendo el fármaco, dando paso a una reinfección y a un nuevo

tratamiento aumentando considerablemente su costo, y todo esto sin contar que los pacientes suelen olvidar la toma o aplicación del medicamento lo cual lleva a otra desventaja importante que es la resistencia por parte de los microorganismos a fármacos antimicóticos.²⁰ Aunado a todo lo anterior y hablando específicamente de un tratamiento tópico debemos de tener presente la naturaleza de las uñas humanas, que presentan una estructura muy "apretada", pues están formadas por células que contienen una alta cantidad de queratina, dichas células están fuertemente adheridas entre sí y difícilmente permiten la penetración de alguna sustancia. Actualmente, en nuestro país, se ha intentado introducir el uso tópico de la Urea, actuando como queratolítico, obteniendo buenos resultados en el tratamiento de onicomiosis.^{4,47} Las sustancias queratolíticas tienen como acción la de romper la queratina. Los principios activos que generalmente se utilizan son diversos, aunque hay una gran inclinación por los de tipo imidazol debido a sus excelentes resultados en la eliminación de los microorganismos productores de onicomiosis.²⁸ Con todo esto, sucede en muchos casos, que a pesar del gran número de principios activos contra esta enfermedad y de preparados que los contienen, los resultados curativos no son exitosos y si muy costosos, por lo que se requiere de tratamientos cortos y efectivos. Un ejemplo actual lo tenemos en el servicio de Dermatología del Hospital "Dr. Manuel Gea González" (México), en pacientes con onicomiosis se ha demostrado la utilidad de los tratamientos combinados, sistémico y tópico (utilizan a la Urea) y la mejor dosis de los antimicóticos

orales, sin embargo, a pesar de la frecuencia de estas onicopatías, aún no se cuenta con el tratamiento ideal para resolverlas.⁴

Los sistemas terapéuticos de acción sostenida nos permiten la obtención de preparados farmacéuticos para el control adecuado de una enfermedad ya que el nivel terapéutico se mantiene constante. Mediante su desarrollo se obtienen diseños de medicamentos para vía oral y también para vía tópica. Su característica principal es que la liberación del fármaco se da en el sitio en donde el efecto se requiere sea el máximo y se mantenga constante durante un tiempo determinado.

Pocos son los estudios realizados en uñas humanas para eliminar alguna enfermedad presente en las mismas, generalmente se trata de estudios "in vivo". En relación a estudios "in vitro" los estudios reportados respecto a la permeabilidad de la uña humana son pocos enfocados principalmente a aspectos fisicoquímicos siendo un aporte muy importante ya que se han establecido los posibles mecanismos de transporte de un difusante a través de la uña humana.⁴⁵

Tecnológicamente para desarrollar un sistema terapéutico de acción sostenida de ésta magnitud se requiere realizar un estudio de difusión, éste puede dividirse en dos partes: "in vitro" e "in vivo". Ambas partes comprenden el transporte de una sustancia a través de una membrana. La parte "in vitro", generalmente, requiere de un sistema difusional adecuado (celdas de difusión), aunque comercialmente se encuentran disponibles una gran variedad, éstas no son muy accesibles. El estudio "in vivo" se realiza con pacientes y se infiere si lo

encontrado "in vitro" es factible analizando la evolución de la enfermedad en el mismo paciente.¹⁹

En este trabajo se desea realizar un estudio "in vitro" que nos permita establecer la permeabilidad de la uña humana para antimicóticos tipo imidazol en presencia de sustancias queratolíticas como base para el desarrollo de una forma farmacéutica en el tratamiento tópico de onicomycosis.

En forma general, para llevar a cabo esta investigación "in vitro", se realizó lo siguiente:

1. Desarrollo de una técnica analítica para cuantificar a los antimicóticos tipo imidazol.
2. Desarrollo de celdas de difusión para probar la permeación de la uña frente a los antimicóticos tipo imidazol.
3. Seguimiento del efecto de las sustancias queratolíticas sobre la uña apoyando la información con micrografías. (Estudio por Microscopía Electrónica de Barrido).
5. Establecimiento de la permeabilidad de la uña humana a antimicóticos tipo imidazol en base a lo obtenido en el punto anterior. (Estudio de difusión)

Por último indicamos la forma en que se ha estructurado el presente trabajo.

Iniciamos con Generalidades, Capítulo I, en el que se habla de las características de: uñas humanas, onicomycosis, tratamiento de onicomycosis, celdas de difusión y difusión a través de la placa ungueal.

El Capítulo II se refiere a la Parte experimental, que contiene lo relacionado a material y métodos: Evaluaciones previas (se incluyen algunos resultados), Estudio de Microscopía Electrónica de Barrido y Estudio de Difusión.

En el Capítulo III se muestran los Resultados obtenidos, referidos a los Estudios de Microscopía Electrónica de Barrido y de Difusión.

En el Capítulo IV se presenta la Discusión ó Análisis de los resultados presentados en el Capítulo anterior.

Las Conclusiones de toda la investigación (Bibliográfica y experimental) se indican al finalizar el capítulo cuatro.

Se han incluido dos apendices: Apendice A en el que se incluyen las características fisicoquímicas, biológicas de los principios activos utilizados, mientras que en el Apendice B se presenta el análisis estadístico realizado a las curvas de calibración para cuantificar antimicóticos tipo imidazol.

Finalizamos el presente trabajo con las Referencias bibliográficas consultadas.

CAPITULO II

OBJETIVOS



Para realizar el presente estudio se han planteado los siguientes objetivos:

OBJETIVO GENERAL.

Realizar un estudio "in vitro" para establecer la permeabilidad de la uña humana utilizando tres antimicóticos tipo imidazol: Itraconazol, Ketoconazol y Nitrato de miconazol en presencia de sustancias queratolíticas, como base para el desarrollo de una forma farmacéutica en el tratamiento tópico de onicomiosis.

OBJETIVOS ESPECIFICOS.

* Desarrollar una técnica analítica sencilla para la determinación cuantitativa de los antimicóticos tipo imidazol: Itraconazol, Ketoconazol y Nitrato de miconazol.

* Establecer para la técnica la linealidad del sistema, la relación entre concentración y absorbancia, si existe diferencia significativa entre dos días y analistas diferentes e inferir su aplicación como técnica de análisis de los antimicóticos tipo imidazol.

* Determinar la interferencia de las sustancias queratolíticas en la técnica analítica de cuantificación de los antimicóticos tipo imidazol.

* Diseñar y construir una celda de difusión para el estudio de permeabilidad que permita el uso de uñas humanas como membrana, entre compartimentos donador - receptor.

* Determinar con ayuda de Microscopía Electrónica de Barrido el grado de afectación por parte de las sustancias queratolíticas sobre la uña humana a 37 °C. apoyando la información obtenida con micrografías.

* Realizar el seguimiento de difusión de los antimicóticos tipo imidazol (Itraconazol, Ketoconazol y Nitrato de miconazol), utilizando uñas humanas como membrana con y sin presencia de sustancias queratolíticas (Acido salicílico, Urea y Papaina, a 37°C.

CAPITULO III

GENERALIDADES



II.1. GENERALIDADES DE LA UÑA

1.1 DEFINICIONES

Las uñas forman parte del tejido epitelial, son un anexo de la piel cuyo fin es el de proteger. Se caracterizan por estar formadas de capas puramente celulares.⁴⁷ Son una modificación de las células epidérmicas cornificadas, están compuestas de queratina dura.²⁶ La queratina sintetizada se conserva como residuo estructural de las células vivas. La queratina de la uña esta constituida por cadenas de péptidos en la configuración helicoidal α .⁴² Así, a este tipo de queratinas se les conoce como escleroproteínas (albuminoides).⁴⁷

Las queratinas son estables e insolubles en agua, inertes químicamente y no se digieren con facilidad por las proteasas comunes.⁴²

Biológicamente son inertes y son producto de los tejidos vivos subyacentes.⁴⁷ Se ha propuesto recientemente que la queratinización es una respuesta al decremento del metabolismo celular y disminución del abasto nutricional.⁷

1.2. FORMACION Y ESTRUCTURA DE LA UÑA.

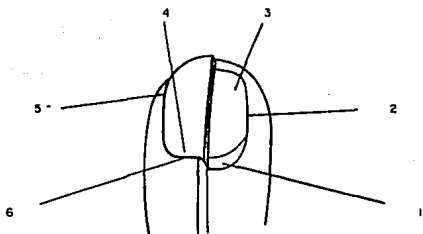
La uña se halla situada sobre el lecho de la uña, en la que la

dermis está dispuesta en forma de eminencias en lugar de papilas como en la piel. El lecho de la uña presenta una rica inervación y una abundante irrigación sanguínea. La parte proximal de la uña se halla en un repliegue de la piel, el *surco ungueal*; la uña es más delgada en esta región. El *cuerpo de la uña* es una parte no cubierta y que se halla firmemente unida al lecho de la uña. La extremidad distal de la uña es libre -es el *borde libre*- y en cada lado está rodeada de un pliegue de piel denominado *pliegue de la uña*.³⁵

La formación de la uña se origina en la *matriz*, y se efectúa gracias al proceso de proliferación y diferenciación activa de las células epiteliales ahí situadas, que gradualmente se queratinizan formando una placa córnea (células queratinizantes).⁷

Así la uña queda constituida por láminas córneas compactas fuertemente adheridas entre sí, que crecen en sentido distal de los miembros, deslizándose sobre el *lecho ungueal* (*Hipóniquio*), el cual tiene una estructura típica como la de la piel pero no participa en la formación de la uña.²⁶

Las células queratinizantes, retienen fragmentos nucleares y están fuertemente adheridas entre sí. En el extremo proximal de la uña se observa una media luna blanca, la *lúnula*, la cual algunos autores proponen que se debe a la reflexión de la luz de la interfase entre la matriz y el lecho ungueal,⁷ y otros la refieren a el aire mezclado en la matriz de queratina. En esta región la matriz no está adherida al lecho ungueal.²⁶ (FIGURA 1)



- | | |
|----------------------------------|--------------------|
| 1. Matriz. | 4. Lúnula. |
| 2. Pliegue de la uña. | 5. Borde proximal. |
| 3. Lecho ungueal (Hipoponiquio). | 6. Eponiquio. |

FIG. 1 ESTRUCTURA DE LA UÑA HUMANA^{2d}

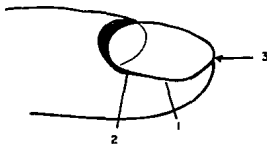
En promedio las uñas crecen de 0.8 - 1.0 mm por semana, a menos que dicho crecimiento sea inhibido por alguna enfermedad.^{2d} La intensidad del crecimiento de la uña difiere según la edad. Las de las manos crecen más rápido que las de los pies; todas crecen más rápidamente en verano que en invierno.²² Así la regeneración de una uña en un dedo de la mano ocurre de tres y medio a cinco y medio meses; la regeneración de una uña de un dedo del pie ocurre de seis a ocho meses.^{2d}

1.3. ULTRAESTRUCTURA Y COMPOSICION DE LA UÑA.

La matriz de la uña esta compuesta de una capa basal y varias capas de células poligonales, lo cual corresponde a la capa escamosa en la epidermis. Las células poligonales contienen abundantes gránulos de queratohialina lo que hace que se observen blanquecinas y turbias. Como las células de la matriz sufren mitosis, ellas se mueven hacia arriba a la región de la superficie de la placa de la uña, también hay un movimiento distal y llegan a ser completamente queratinizadas.⁷

1) Placa de la uña.

La placa de la uña es una estructura oblonga la cual es curva de lado a lado, y esta insertada dentro de un surco, el surco o borde lateral de la uña, en cada margen lateral. (FIGURA 2)



1. Surco lateral

3. Borde libre

2. Margen lateral.

FIG. 2 PLACA DE LA UÑA HUMANA, VISTA LATERAL

El borde libre de la uña es pardusco o amarillento y es continuo hacia el lecho de la uña por el hiponiquio. La superficie externa de la placa de la uña es normalmente lisa y brillante; la superficie posterior esta marcada por arrugas las cuales pueden ser atacadas fuertemente por enfermedades, dentro de depresiones longitudinales en el lecho de la uña.

ii) Capas de la placa de la uña.

Se han propuesto tres diferentes capas de la placa de la uña:

- a) Dorsal.
- b) Intermedio.
- c) Ventral.

a) CAPA DORSAL.

La capa dorsal se origina desde la porción proximal del pliegue dorsal de la uña. Las células queratinizadas se separan de la matriz, y son removidas distalmente por la masa de nuevas células formadas en la matriz, rápidamente pierden su núcleo. Más profundo a la placa dorsal esta una zona transicional compacta, en la cual las células con núcleo contraído pueden ser observadas.

b) PLACA INTERMEDIA.

La placa de la uña intermedia es más gruesa que la capa dorsal, formando el volumen de la placa de la uña. Esta capa se deriva de la

uña disminuida de la raíz de la matriz, sin la interposición de una capa granular. Remanentes nucleares basofílicos son visibles en la capa intermedia y una zona transicional ancha está presente con núcleo prominente.

○ CAPA VENTRAL.

La placa ventral de la uña es una capa delgada, una a dos células de grosor, lo cual forma la base de la placa de la uña, dicha placa esta en contacto directo con el lecho ungueal. Las células en esta región surgen de las células del lecho de la uña y son acarreadas hacia delante y periféricamente en la dirección del crecimiento de la uña. La sangre localizada entre el lecho ungueal y la placa es acarreada distalmente en la misma velocidad que la velocidad de crecimiento de la placa de la uña.⁷

iii) Irrigación sanguínea.

La matriz y el lecho de la uña poseen un rico suministro de sangre proveniente de dos arcos arteriales que se encuentran debajo de la lámina de la uña.⁴⁷ Estos arcos arteriales anastomóticos proveen la sangre abasteciendo a la placa ungueal, se conectan con dos arterias laterales digitales y están situadas profundamente en contacto con el periosteo. Un arco es paralelo a la lúnula, y el otro es paralelo al margen libre de la uña.⁷

En la profundidad de la dermis hacia el lecho de la uña está una

anastomosis arteriovenosa especializada, la cual esta rodeada por células contráctiles, las células glomus. Estas células glomus cutáneas pueden cerrar el paso directo de la sangre desde la arteria a la vena, sin pasar a través del lecho capilar, y es así un instrumento en la regulación de la presión sanguínea, y en cambios de temperatura de los dígitos. También existe una arteria de medio tamaño conectada a la interfalange distal junto con el pliegue de la uña, esto puede ayudar para explicar la relación entre los cambios de las uñas y las enfermedades de los empalmes o uniones.⁷

iv) Composición química de la uña.

El componente más importante de la uña que es la queratina dura, exhibe un alto contenido de sulfuro, es decir, aproximadamente 3.2 %, principalmente en forma de cisteína (9-12 % del peso de la uña). En enfermedades el contenido de sulfuro de una uña puede ser más bajo de lo normal. Las fibrillas de queratina están orientadas principalmente paralelas a la superficie de la uña de lado a lado. Existe una diferenciación natural entre la placa de la uña dorsal, más dura, y la placa de la uña intermedia, más flexible. La uña contiene aproximadamente un 6 - 12 % de humedad y un 0.12 - 0.76 % de grasa, en adultos, y un 1.38% en bebés. El calcio constituye aproximadamente el 0.02 - 0.04 % del peso, y no contribuye a su dureza. Contiene además fósforo, carbonato y arsénico. El contenido de calcio disminuye con la edad después de 40 años.^{7,38,48} (FIGURA 5)

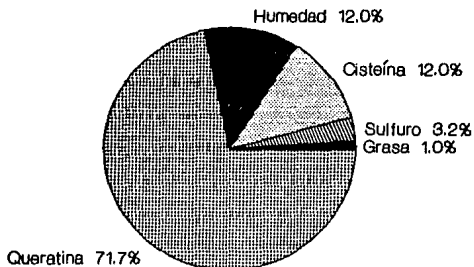


FIG. 3. COMPOSICION QUIMICA DE LA UÑA HUMANA

1.4. ASPECTO FISICO.

La uña presenta un color blanquecino, aunque sobre el lecho ungueal se percibe rosado debido a la irrigación sanguínea. Posee brillo observándose lisa la superficie, con ligeros surcos longitudinales más o menos paralelos.⁴⁰

El agua y la grasa contribuyen a darle su flexibilidad y brillo característicos a la lámina. La superficie de la placa ungueal presenta una película lipídica, pero diversos agentes locales la

despojan de su secreción protectora, entre ellos el álcali de los jabones o detergentes desengrasantes de uso casi inevitable para las amas de casa, que se combina con las grasas de la uña y ataca a la queratina, haciéndola quebradiza.²⁸

II.2. ONICOMICOSIS

2.1. DEFINICIONES.

Onicomycosis es toda infección de la uña causada por cualquier hongo, levadura o moho. No debe confundirse con tifa ungueal o de la uña, pues estos términos se refieren solamente a las infecciones causadas por dermatofitos.¹⁸

Las onicomycosis son comunes, dentro de todas las enfermedades de la uña, ocupan un 15 a 40 %, aproximadamente.^{18, 18} En relación a todas las enfermedades de la piel ocupan cifras de dos a tres por ciento.⁸

(FIGURA 4).

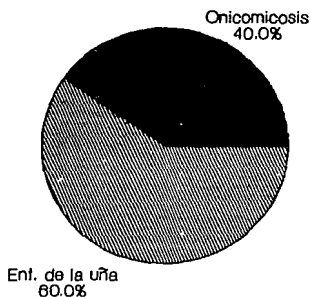


FIGURA 4. PORCENTAJE DE ONICOMICOSIS CON RESPECTO AL TOTAL DE ENFERMEDADES EN LA UÑA.

Las uñas de los pies se infectan más frecuentemente que las de las manos esto en relación de cuatro a uno.⁴⁴

Las onicomycosis también pueden ser causa de otras infecciones en otras áreas de la piel o bien productoras de cuadros de hipersensibilidad.⁹

Una vez establecida la onicomycosis, constituirá un foco permanente de infección para el pie, dando lugar, de esta manera, a un círculo vicioso que requiere el tratamiento simultáneo de los dos

padecimientos. De ordinario, la iniciación de la parasitosis se hace de uno de los bordes laterales, para seguir después el borde libre y hasta el final atacar toda la uña, la que se vuelve gruesa, estriada, de color amarillento y quebradiza, acumulándose debajo de su borde libre gran cantidad de detritus que se desprenden con facilidad, en los que se encuentra en abundancia el parásito productor, por lo que se prefiere este material para tomar las muestras y hacer un examen micológico y no el raspado de la superficie de la uña, en donde los elementos micóticos son muy escasos, con lo que se corre el riesgo de no encontrarlos. La matriz de la uña no está afectada, ya que se sabe que los dermatofitos no atacan los tejidos vivos, quedando así confinada la infección a la queratina. Ya evolucionada la onicomycosis es esencialmente crónica, lo que da lugar a que con el transcurso del tiempo se afecten cada vez mayor número de uñas y, en ocasiones todas ellas. Prácticamente la onicomycosis no presenta síntomas subjetivos y así es transportada por años sin mayores molestias.⁴¹

2.2 CARACTERISTICAS CLINICAS.

Los primeros signos de onicomycosis se van hacer presentes hacia la porción distal de la misma, el hongo al asentar y progresar en lo compacto de la uña, en sus numerosos estratos córneos, los separa y les quita cohesión entonces ésta se observa engrosada, frágil o

"fofa", con frecuencia se reduce de tamaño, "carcomida", cambia de coloración y se observa amarillenta, amarillento-café u oscura.³⁰ Los hongos se introducen y fraccionan la uña más que disolverla.⁴¹

De forma inexplicable, la infección micótica puede afectar sólo algunas de las uñas, dejando las restantes completamente intactas. Una atractiva hipótesis propone que las uñas de crecimiento más lento se infecten con mayor facilidad. Esto, ciertamente es así en el síndrome de Cushing, donde la curación quirúrgica por resección del tumor va seguida de la desaparición espontánea de la onicomícosis.^{3, 13, 15}

Por lo general, la onicomícosis se acompaña de infecciones en otras localizaciones. En la tifa de los pies, especialmente cuando están afectados los pliegues interdigitales, las uñas pueden actuar como reservorio a partir del cual se originan las reinfecciones si las condiciones ambientales son adecuadas.¹⁵

2.3. ONICOMICOSIS EN MEXICO.

En México pocos estudios se han realizado al respecto, poca importancia se le da a esta onicopatía tanto en México como en el resto del mundo, por lo que es difícil conocer como se presenta a menudo la onicomícosis en la población en general, pues la ayuda médica o dermatológica es usualmente solicitada en los casos más severos. En suma, no todos los cultivos proporcionan resultados positivos, aún con casos microscópicamente positivos.³

En estudios recientes (1977 - 1987), se confirmaron el 60 por ciento de onicomicosis, en la mitad se aisló al agente causal. El 54 por ciento fue causado por *Dermatofitos*, 45 por ciento lo causó *Candida*, el uno por ciento por hongos oportunistas, así mismo se observó un cuatro por ciento en casos mixtos entre los dos primeros grupos.³

De los pocos datos disponibles de estudios realizados en México existe información reportada en los años de 1957, 1972 y 1989 sobre onicomicosis causada por dermatofitos, ésta información se resume en la TABLA 1.³

TABLA 1. LOS TRES DERMATOFITOS MAS FRECUENTEMENTE PRODUCTORES DE ONICOMICOSIS EN MEXICO (1957, 1972, 1989).³

Dermatofito	1957 (%)	1972 (%)	1989 (%)
<i>T. rubrum</i>	50	24.7	87
<i>T. tonsurans</i>	37	13.4	5.5
<i>T. mentagrophytes</i>	13	21.3	3.0

Como se observa las tres especies más frecuentes de dermatofitos son las mismas, con las variantes propias de origen de la muestra

estudiada. No obstante, llama la atención observar como la frecuencia de *Trichophyton tonsurans* ha disminuido sensiblemente desde 1957. Este hecho está en relación con la mejoría del nivel socio-económico de la población.⁸

Con respecto a *Candida*, siempre se ha observado como segundo agente patógeno, después de *Dermatofitos*, e inclusive un agente patógeno aislado (3 %) que llegó a ser causante de onicomycosis fue *Pityrosporum ovale* (1972), el cual ya no se presenta con la misma incidencia en los estudios recientes.⁹

2.4. INCIDENCIA EN LA POBLACION.

La incidencia de onicomycosis en la población está en relación a la edad, pues se sabe que es mayor en ancianos. Los niños rara vez son infectados, lo cual se atribuye a el rápido crecimiento de las uñas, un proceso natural en el cual espontáneamente se elimina al hongo. Por otra parte, el padecimiento afecta a los dos sexos por igual.^{10,16}

Se aumenta el riesgo de contaminación en amas de casa ya que se mantienen expuestas a diferentes factores, por ejemplo: humedad, traumatismos, etc.⁵

2.5. MICROORGANISMOS QUE LA CAUSAN.

La onicomicosis puede ser causada por *Dermatofitos*, levaduras u mohos.¹³ En México, como ya se mencionó anteriormente, el mayor porcentaje es causado por *Dermatofitos*, siendo *Candida* el segundo en importancia, el resto del porcentaje, que es mínimo, es causado por otros patógenos.³

Las levaduras son la causa más común de onicomicosis en las uñas de los dedos de la mano. En la onicomicosis de el pie, los *Dermatofitos* es el agente causante principal, con mohos en segundo lugar. Las levaduras rara vez causan onicomicosis en pie.¹³

1) Onicomicosis causada por dermatofitos.

Este tipo de onicomicosis se conoce generalmente como tifa de las uñas (*tinea unguium*).³

Pacientes con infecciones dermatofíticas en otras partes del cuerpo presentan, generalmente, onicomicosis.¹⁵

a) Distribución en México.

En México se presentan con la siguiente distribución porcentual: *T. rubrum*, 87%; *T. tonsurans*, 5.5%; *T. mentagrophytes*, 3%; *H. canis*, 3% y *E. floccosum*, 1.5 %. Como en otras latitudes, la parasitación por *Microsporum* y *Epidermophyton* es rara. Con frecuencia se observa, causado por *T. rubrum*, el llamado síndrome de una mano y

los dos pies, que se manifiesta por onicomicosis o tifa de una mano y los dos pies.⁸ (FIGURA 5)

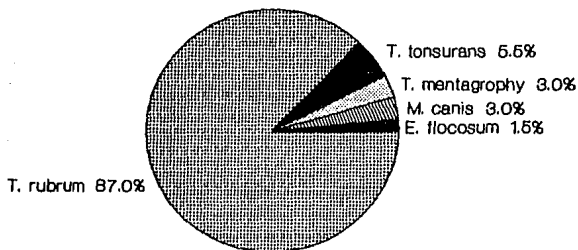


FIGURA 5. DISTRIBUCION PORCENTUAL DE DERMATOFITOS CAUSANTES DE ONICOMICOSIS EN MEXICO

A nivel mundial se ha encontrado que *T. mentagrophytes*, infecta principalmente las uñas de los pies al igual que *E. floccosum*.¹⁸

b) Factores predisponentes.

Esta micosis se presenta en personas susceptibles; es de transmisión exógena y favorecida por traumatismos; constituye diez por ciento de las dermatofitosis. Todos los dermatofitos son capaces de producirla, pero cada área geográfica tiene sus propias especies. Entre los hongos de distribución mundial se tienen: *Trychophyton rubrum*, *Microsporun canis*, *M. gypseum*, *Epidermophyton floccosum* y *T. tonsurans*.^{3,13,15}

Se le considera un padecimiento frecuente en deportistas, sobre todo en quienes practican la natación. Son factores favorecedores: calor, sudor, uso de calzado estrecho o de plástico, enfermedad vascular periférica y depresión de la inmunidad. El sistema inmune del paciente es importante; en dermatofitosis superficial crónica y enfermedad dermatofítica, las cuales son caracterizadas por depresión de la inmunidad mediada por células innata o adquirida, se observa onicomícosis particularmente de una naturaleza crónica y recurrente. Se ha relacionado con la mala higiene y la costumbre de no secarse adecuadamente los pies. En la actualidad es muy probable su relación con el uso de zapatos tenis.^{3,13,16}

c) Incidencia en la población.

El padecimiento afecta a hombres y mujeres por igual, con franco predominio de los 20 a los 40 años de edad (48 %), si bien se presenta desde los dos años de edad hasta los 90 años. En cuanto a la

localización, los datos indican que aproximadamente en 70 % se afectan las uñas de pies, sobre todo el primer dedo, en 27 % las uñas de las manos, y en 3 %, tanto manos como pies.³ (FIGURA 6).

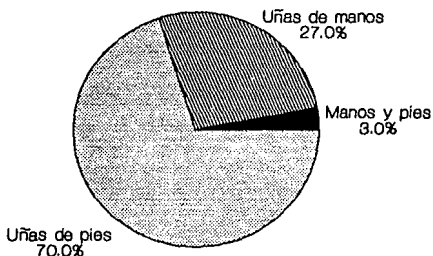


FIGURA 6. DISTRIBUCION PORCENTUAL DE LA LOCALIZACION DE ONICOMICOSIS EN UÑAS DE MANOS Y PIES CAUSADA POR DERMATOFITOS

La onicomiosis causada por dermatofitos solo se ha reportado el 43 por ciento en pacientes geriátricos en México, mientras que en otras poblaciones la incidencia se reporta del 90 por ciento, del que

70 por ciento se divide entre empleados, estudiantes y amas de casa. Es baja la incidencia en campesinos debido al uso de sandalias o a la falta de calzado.⁹

Un aspecto importante que se presenta es que si bien pueden infectarse todos los dedos del pie, espontáneamente algunas de las uñas pueden curarse, o bien algunas pueden no infectarse a pesar de la presencia de uñas infectadas.¹⁰

c) Clasificación.

De acuerdo a sus características clínicas de este tipo de onicomycosis se presenta su clasificación. Las características clínicas dependen del sitio sobre el cual las uñas son infectadas.¹⁰ La onicomycosis causada por dermatofitos está clasificada en cinco tipos, que a continuación se enlistan.^{9,10}

1. Onicomycosis subungueal distal.
2. Onicomycosis lateral.
3. Onicomycosis proximal.
4. Onicomycosis blanca superficial.
5. Onicomycosis distrófica.

ii) Onicomycosis causada por *Candida*.

Entre las diferentes localizaciones de las candidosis, la localización ungueal ocupa el 35-45 por ciento. *Candida albicans* es la

causa primaria de onicomiosis por levadura, aproximadamente un 70 por ciento. También se han aislado otras levaduras infecciosas: *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* y *C. pseudotropicalis*.^{3,40} (FIGURA 7).

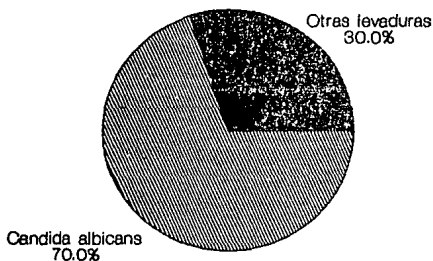


FIGURA 7. DISTRIBUCION PORCENTUAL DE ONICOMICOSIS CAUSADO POR CANDIDA.

La onicomiosis causada por *Candida* predomina en adultos (20 a 30 años de edad), disminuyendo conforme a la edad, en cuanto a los niños, se observa una incidencia semejante a la producida por dermatofitos.

la incidencia en adultos muestra que es de dos a tres veces más alto en mujeres que en hombres. Predomina la afección en las uñas de las manos, con 60 por ciento; en los pies se ve en 33 por ciento, y en ambos, en siete por ciento. (FIGURA 8) Es mayor su frecuencia en amas de casa (44%) y en empleados y estudiantes (40 %).⁹

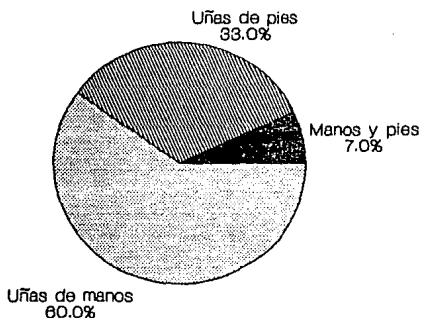


FIGURA 8. DISTRIBUCION PORCENTUAL DE ONICOMICOSIS EN UÑAS DE MANOS Y PIES CAUSADA POR CANDIDA.

a) Factores predisponentes.

Esta micosis es favorecida por múltiples factores locales,

generales, yatrogénicos e inmunológicos.^{1,2,16}

Los factores locales promueven la formación de lesiones. Un daño único o repetido en la cutícula durante el manicure y pedicure, o la separación de su lecho de la placa ungueal (onicolisis), causado por factores químicos o mecánicos promueven la contaminación. Ambos, maceración y oclusión promueven el desarrollo de candidosis, así como la hiperhidratosis y manos frías. Como se mencionó anteriormente, el número de infecciones en amas de casa, enfermeras, personal doméstico, cocineras, lava platos es más alto que en las otras ocupaciones. El contacto con sustancias que contienen azúcar explica porque la candidosis frecuentemente ocurre en confiteros y gente que maneja fruta.^{1,2,18}

Los factores generales que pueden llevar a un desarrollo de candidosis son: diabetes mellitus, hipoparatiroidismo, enfermedad de Addison, disfunción de la tiroides, malnutrición, mala absorción, discracia tal como leucemia o agranulocitosis, tumores malignos, y en condiciones postoperativas.^{1,18}

Los factores yatrogénicos (corticoesteroides y sustancias antimicóticas y antibióticos), juegan un papel siempre en aumento el desarrollo no solamente de candidosis cutánea, sino también del tipo visceral.^{1,18}

Los factores inmunológicos causan paroniquia y oniquia, las cuales son especialmente resistentes. Candidiasis mucocutánea crónica, caracterizada por infección crónica de la uñas, la mucosa y la piel, es un buen ejemplo de la enfermedad. Usualmente aparece en la

infancia.^{1,18}

La infección de la placa de la uña se presenta principalmente como un resultado de paroniquia crónica.¹⁸

b) Clasificación.

Las características clínicas de la onicomycosis causada por *Candida* dependen del sitio sobre el cual la uña es infectada.⁵

Los tipos de onicomycosis causados por *Candida* se presentan a continuación.^{1,9,18}

1. Paroniquia causada por *Candida*.
2. Onicolisis causada por *Candida*.
3. Oniquia.

iii) Onicomycosis causada por oportunistas.

Muchos hongos son fitopatógenicos o saprofiticos pero no patógenos para humanos. Algunos, sin embargo, forman filamentos en las substancia ungueal lo cual es detectable por medio de una microscopia directa.¹⁹

Predominan en personas de más de 80 años de edad, preferentemente invaden las uñas de los dedos grandes del pie. También se observan en jóvenes. Son favorecidas por inco-grifosis, dedos sobrepuestos, enfermedad periférica y contacto con ciertas plantas.^{9,18}

Los agentes etiológicos que frecuentemente se observan en el pie son *Scopulariopsis brevicaulis* y especies de *Aspergillus*. *Fusarium oxysporum* y *Alternaria tenuis* afectan preferentemente las uñas de las manos, mientras que *Hendersonula toruloidea* infecta a pies y manos. *H. toruloidea* puede ser responsable de paroniquia y puede aún desarrollarse por sí misma en la piel, así como también provocar lesiones en las manos.^{1,34}

Las lesiones de los dedos grandes del pie son onicolisis y paquioniquia; ellas corresponden con la onicomcosis distal o lateral en la sección de dermatofitos.³

La enfermedad menos frecuente es la onicomcosis blanca superficial.¹³ Se han observado casos por *Fusarium*, *Scopulariopsis* y *Aspergillus*, todos ellos capaces de producir cromoniquia.^{1,3,13}

2.6. ONICOMICOSIS Y OTRAS ENFERMEDADES.

Existen enfermedades que pueden ser causas posibles de onicomcosis como es la psoriasis, liquen plano, transtornos metabólicos, traumatismos, enfermedades reumáticas.^{5,16}

Es difícil diferenciar las dermatofitosis ungueales causadas por cosméticos de uñas de las onicomcosis.³⁸

Se presentan numerosas manifestaciones dermatológicas en humanos infectados de SIDA, entre esa variedad de enfermedades las primarias son afecciones en uñas y cabello. Siendo una de estas la onicomcosis,

principalmente la subungueal blanca proximal, la cual parece estar relacionada a los efectos de la infección de HIV sobre el sistema inmune. La incidencia de dermatofitosis en pacientes que son seropositivos para HIV es similar a lo encontrado en grupos de gente no seropositivos. Dentro de los microorganismos aislados, en este tipo de pacientes se encuentran: *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Epidermophyton floccosum*.⁹⁷

Constituye un problema importante el diagnóstico diferencial con Psoriasis, que puede dar manifestaciones similares.⁹

II.3. TRATAMIENTO DE ONICOMICOSIS

El tratamiento de onicomicosis es a menudo largo y difícil, y no existe un tratamiento estandar. Actualmente es muy difícil limpiar las uñas de hongos.¹⁸

Estadísticas de éxitos terapéuticos indican que entre más extensa es la afección menor es la posibilidad de curación, por ejemplo, solo uno de once casos obtienen curación si una o más uñas están

completamente infectadas.⁴¹

Varios factores deben considerarse antes de decidir el tratamiento apropiado:

a) La enfermedad puede ser causada por diferentes microorganismos.

b) Existen diferentes formas de expresión clínica y la respuesta terapéutica difiere por consiguiente.

c) Las uñas de las manos responden mejor y más rápido al tratamiento que las uñas de los pies, requieren la mitad de tiempo.

d) No es fácil siempre identificar un hongo aislado como un patógeno causante o comensal para la onicopatología.

La onicomycosis rara vez desaparece espontáneamente y su reincidencia es común después del tratamiento. La localización de la infección y la identificación de el hongo son factores importantes, como quiera que sea un tratamiento específico no debe ser iniciado hasta que el patógeno responsable ha sido identificado. Esto es necesario para evitar la administración de antimicóticos para onicopatías diferentes de onicomycosis. Los oportunistas no responden a antimicóticos orales, por lo que para estos no pueden ser prescritos.¹³

3.1. FORMAS DE TRATAMIENTO.

Tres formas de tratamiento son posibles:

- a) Tratamiento sistémico.
- b) Tratamiento local.
- c) Remoción de la queratina afectada.

A menudo se acorta el tiempo de tratamiento si se combinan los tres tratamientos entre sí. Medidas químicas o quirúrgicas también pueden acortar la duración del tratamiento, en algunos casos reduciéndolo considerablemente.⁴³

3.2. TRATAMIENTO SISTEMICO.

Existen disponibles varios principios activos para su uso en el tratamiento de onicomosis por vía oral. En el caso de los imidazoles algunos son activos también por vía tópica.⁴³

1) GRISEOFULVINA.

Es un antibiótico derivado de especies como *Penicillium griseofulvum*. Es efectiva solamente contra dermatofitos. La Griseofulvina impide la proliferación del hongo en las partes ungueales que crecen durante la toma regular e ininterrumpida del medicamento, el cual interfiere en la síntesis y polimerización de los ácidos nucleicos.

La Griseofulvina es usualmente administrada en dosis diarias de 0.5 - 1.0 g, pero dosis de 2.0 g/diario son ocasionalmente

administradas en adultos. Para las manos el tratamiento mínimo es de seis meses y para los pies, de 12 a 18 meses. Por administración de formas microcristalinas o ultramicrocristalinas, la reabsorción puede ser aumentada y la dosis reducida a la mitad. La reabsorción también puede mejorarse si la medicación es tomada con comida grasosa. Pueden ocurrir interacciones con fenobarbital y anticoagulantes del tipo de la cumarina.²⁸

El tratamiento debe ser continuado hasta una cura completa clínica y micológica. Las uñas de los pies no responden tan bien como las uñas de las manos y tiene una alta probabilidad de reincidir. Después de dos años de tratamiento, la cura micológica y clínica para uñas de pies infectadas por dermatofitos, tiene una probabilidad de aproximadamente 50 a 60 por ciento. La reincidencia es común, y alrededor del 40 por ciento de las uñas curadas pueden llegar a reinfectarse dentro de un año. *T. mentagrophytes* var. *interdigitale* responde clínicamente mejor que *T. rubrum*, no obstante *T. mentagrophytes* es menos sensible en pruebas "in vivo".^{19,41}

Los dermatofitos se hacen resistentes a este antimicótico. Existen datos con respecto del por ciento de recuperación con este antimicótico:⁴²

	%
Tiña capitis	93.1
Tiña de piel glabrous	64.8
Tiña de las uñas de las manos	56.9
Tiña de las uñas de los pies	16.7

Sólo es eficaz en el 15-18.7 % , en los dedos de los pies, por lo que en estos su uso esta limitado.⁴¹ Además el tratamiento es caro y prolongado.¹⁶

a) *Efectos adversos.*

Los efectos adversos asociados con el tratamiento de griseofulvina incluyen:²⁸

1. Hepatotoxicidad.
2. Intolerancia gastrointestinal (mala digestión, diarrea, gastritis).
3. Dolor de cabeza.
4. Efectos hematológicos incluyendo leucopenia y anemia crónica.
5. Lupus eritematoso como erupciones.
6. Confusión mental.

Como resultado de los posibles efectos adversos, la interrupción del tratamiento algunas veces es necesario; y el hemograma del paciente debe ser evaluado cada mes.^{13,28}

ii) KETOCONAZOL

Es un derivado del imidazol que es efectivo en el tratamiento de infecciones de *Candida* y *dermatofitos* en uñas pero, también tiene un pequeño efecto sobre los mohos, tales como *S. brevicaulis*. El

ketoconazol interfiere con el metabolismo del hongo a nivel de Citocromo P450, bloqueando la conversión de lanosterol a ergosterol. Este agotamiento de ergosterol resulta en cambios en la permeabilidad de la membrana, llevando a la muerte celular.

El régimen de dosis para onicomicosis es 200 mg/día, la cual debe ser tomada preferentemente con comida. El tiempo de tratamiento para infecciones por *Candida* es la misma que con griseofulvina. Para infecciones por *Candida* de las uñas de las manos, la duración es alrededor de seis a siete meses.

Los resultados tienden a ser mejores para las uñas de las manos que para las infecciones de las uñas de los pies. Así mismo, para las uñas de los pies, la curación de la infección tiene una buena probabilidad que puede ser reducida por el alto porcentaje de reincidencia después de que el tratamiento es terminado.^{13,28}

a) *Efectos adversos.*

Estos efectos adversos, generalmente, desaparecen al suprimir el fármaco.¹⁵

1. Náusea.
2. Vómito.
3. Dolor abdominal
4. Prurito.
5. Dolor de cabeza.
6. Fiebre.

7. Fotofobia

8. Hepatotoxicidad.

Las ventajas del Ketoconazol sobre la Griseofulvina pueden considerarse las siguientes:^{28,41}

- a) Es activo en onicomycosis causada por *Candida*.
- b) Es activo *in vitro* contra dermatofitos resistentes a Griseofulvina.
- c) Es efectivo contra onicomycosis crónica generalizada por dermatofitos.

Los efectos adversos son más probables en dosis altas durante tratamientos prolongados, tales como los que se requieren en onicomycosis. Reacciones alérgicas serias también pueden presentarse. Estos efectos adversos son muy similares a los que se presentan con la Griseofulvina.^{3,49}

iii) ITRACONAZOL

Es un agente antimicótico, activo oralmente, derivado triazólico. es muy activo "*in vitro*" contra *Dermatofitos* y *Candida spp.*, pero al igual que la Griseofulvina y el Ketoconazol tiene un pequeño efecto sobre mohos.²⁴

El Itraconazol tiene un espectro un poco más amplio que el Ketoconazol (tiene actividad contra *Aspergillus* y *Sporothrix*), y es aproximadamente diez veces más activo que el Ketoconazol "*in vitro*".

contra muchos hongos.²³

En la administración sistémica de Itraconazol se obtienen niveles más altos en la epidermis que en el plasma, principalmente debido a la afinidad fuerte del Itraconazol por ciertos tejidos, incluyendo a la queratina.²⁴

Generalmente se acepta que la incorporación de medicación y nutrientes ocurre vía la matriz de la uña, que es la ruta de penetración del fármaco en la placa ungueal. Existe, sin embargo, una segunda ruta, la llamada vía del lecho ungueal. Por esta ruta, el fármaco y los nutrientes penetran por el extremo distal de la placa ungueal mucho más rápidamente, lo que puede ser esperado si se consideran las bases de un crecimiento normal de la uña vía la matriz de la uña. Experimentos indican que el Itraconazol utiliza esta segunda ruta.²⁴

La presencia de Itraconazol puede observarse en la placa ungueal distal después de un mes de tratamiento, y después de cuatro meses, se encuentra un incremento rápido en la concentración. Esto parece indicar que el Itraconazol es inicialmente suministrado vía el lecho ungueal, y después del cuarto mes, tanto por vía del lecho ungueal como la matriz.^{23,24}

En México se ha usado recientemente en onicomycosis, con buenos resultados, utilizando una dosis de 100 mg/día, con tasas de curación de 73 a 92 por ciento.³

Una ventaja sobre los otros antimicóticos revisados es que el Itraconazol es "bien tolerado", lo cual ha sido demostrado en varios

estudios clínicos, así mismo la dosis terapéutica es más baja.^{4,23}

El mecanismo de acción del Itraconazol es comparable con el de Ketoconazol pero tiene un grado mucho más grande de selectividad para el Citocromo P450 del hongo. Esto explica probablemente la ausencia de efectos secundarios en el hígado.^{3,24}

iv) TERBINAFINA

Es una alilamina que es menos activa "in vitro" contra dermatofitos y hongos dimorfos. Es menos activa contra ciertas especies de *Candida* tales como *C. albicans* y *C. tropicalis*. "In vivo" es efectiva contra *Dermatofitos* después de una administración tópica y sistémica.

La Terbinafina también afecta la síntesis de ergosterol: inhibe la conversión de escualeno en éoxido de escualeno por bloqueo de la enzima escualeno epoxidasa. Esta enzima no es del tipo de enzimas de Citocromo P450.¹³

a) Efectos adversos.

Los efectos adversos de terbinafina son raros, pero los siguientes han sido reportados:

1. Síntomas gastrointestinales (náusea, dolor estomacal transitorio).
2. Reacciones alérgicas en piel (1 %).
3. Síntomas moderados no específicos (1 %).

No han sido reportados efectos adversos hematológicos, hepáticos o renales.

El régimen de dosis para terbinafina es 125 mg/día (vía oral, dos veces al día). El tratamiento puede ser acortado (tres a seis meses), para la curación de onicomiosis.¹³

v) ANTIBIOTICOS MACROLIDOS POLIENICOS.

Nistatina y Anfoteracina B son principalmente usados, a menudo en combinación con antibióticos y/o corticoesteroides para el tratamiento de paroniquia crónica.¹³

Con respecto a la Nistatina, desafortunadamente se presentan problemas de solubilidad, estabilidad, absorción y toxicidad que han limitado su uso.¹⁶

En general, los macrólidos se unen a los esteroides de membrana con lo cual alteran las características de permeabilidad de la membrana ocasionando la muerte celular.¹⁶

3.3. TRATAMIENTO LOCAL.

En general las uñas son resistentes al tratamiento, sobre todo tópico, por lo que en la actualidad se trata de aumentar la penetración por oclusión y con agentes adyuvantes en el transporte.³

La queratina es muy resistente a la penetración antiséptica y de

antimicóticos. La remoción parcial o incompleta de la placa ungueal es, sin embargo, necesaria para tales agentes tópicos. exclusivamente el tratamiento local de onicomicosis, si es extenso, puede llevar arriba de 18 meses.¹³

No obstante, la aplicación debe prolongarse al menos durante 90 días, en la espera de resultados satisfactorios.

El tratamiento de las infecciones producidas por hongos plantea muchos más problemas. Ofrece alguna posibilidad la aplicación tópica de medicación después de pulir o raspar minuciosamente las uñas.¹⁵

Generalmente se usan imidazoles y triazoles para la aplicación local variando el grado de resultado.^{3,13}

El imidazol es un grupo químico con gran capacidad reactógena, habiéndose sintetizado numerosos derivados con propiedades farmacológicas muy distintas. Los fungicidas poseen un amplio espectro y en general actúan lesionando la membrana de las células para impedir la síntesis de ergosterol.⁴³

Estos antimicóticos se usan en formulaciones que contienen etanol o bien se presentan como cremas. Limitados casos son curados con estas formulaciones. Por otra parte, antimicóticos sistémicos deben ser usados en el tratamiento de infecciones por dermatofitos para acortar la duración del tratamiento.

Algunos tipos de estas formulaciones son:

1) MICONAZOL EN ALCOHOL (2%).

El miconazol es una alternativa para el tratamiento sistémico de

un número limitado de uñas en pacientes con una respuesta desfavorable a una terapia sistémica o en casos donde la administración oral de antimicóticos esta contraindicada. Puede combinarse, por ejemplo, con una separación químiomecánica.⁹

ii) TIOCONAZOL EN ALCOHOL (8%).

Aplicaciones locales de tioconazol en combinación con Griseofulvina puede acortar el tiempo de tratamiento.¹⁸

iii) AMOROLFILINA O NITRATO DE MICONAZOL EN BARNIZ.

Una reciente formulación es la preparación del antimicótico usando como vehículo barniz. Se cuenta con poca información al respecto, pero dentro de los antimicóticos utilizados está la Amorolfilina y el Nitrato de miconazol. En relación a la primera, comprende una nueva clase de antimicóticos para uso local que ha mostrado gran actividad contra *Dermatofitos* y levaduras "in vitro" a bajas concentraciones. Se ha preparado en un barniz para uñas, que la contiene a concentraciones de dos por ciento y cinco por ciento, y su aplicación es de una o dos veces por semana. El miconazol también ha sido preparado así, con buenos resultados, el tiempo de tratamiento se reduce a un poco más de tres meses.^{19,20,26}

iv) GLUTARALDEHIDO.

Se usa una solución de glutaraldehido al 10 %, como tratamiento tópico efectivo, de acción prolongada, en la infección ungueal tanto de dermatofitos como no dermatofitos.⁴¹

v) OTROS ANTIMICOTICOS.

Se ha experimentado con otros antimicóticos para el tratamiento tópico de la onicomycosis, pero su uso es muy limitado. La separación de la uña en combinación con la Ciclopirosolamina ha sido descrito como un buen tratamiento para la onicomycosis causada por *H. toruloidea*.^{3,42}

Los antibióticos macrólidos polienicos tópicamente se usan para la terapia de infecciones producidas por *Candida*.¹⁶

3.4. REMOCION DE LA QUERATINA AFECTADA.

i) ELIMINACION MECANICA.

Esta puede ser llevada a cabo por recorte, limado, y/o curetaje de la uña, con o sin anestésicos locales. De esta forma es posible acortar el tiempo de tratamiento.

ii) ELIMINACION QUIMICA.

Puede ser realizada con ácido salicílico al 30 %, urea al 40 % (también al 22%) o yoduro de potasio al 50 %. La piel que esta alrededor de la uña es protegida con cinta adhesiva, y el emplasto es aplicado sobre la afección de la placa ungueal y cubierta con celofan o plástico. La porción distal entera de el dedo de la mano o el pie es entonces vendado por una a dos semanas. Después, la uña puede ser removida sin dolor ya sea por levantamiento de la placa ungueal completa o por recorte de las partes anormales, esto se sigue por curetaje ligero hasta una uña normal clínicamente observada en todos los lados. Con uñas muy delgadas la raspadura ligera de la superficie de la uña es necesaria para aumentar la penetración de los agentes.

Las partes infectadas de la uña bajo la pared proximal de la uña, y sobre todo los lados laterales de la placa ungueal no son fácilmente penetradas. Después de la remoción de la uña, es aún necesario aplicar agentes antimicóticos tópicos hasta que una nueva uña es formada. Con este método se acorta el tratamiento comparado con un tratamiento usando Griseofulvina o Ketoconazol.

Esta técnica es indolora y no presenta riesgo de infección o hemorragia, lo que le convierte en un método ideal para tratar a pacientes con diabetes ó insuficiencia vascular y neuropatía.^{13,15}

iv) CIRUGIA.

Probablemente el procedimiento que depara más curaciones es la

extirpación quirúrgica de las uñas.¹⁵

La extirpación parcial del lecho de la uña puede acortar el tiempo de tratamiento en un 50 por ciento. La extirpación completa de la uña no es aconsejable, porque la pérdida de contrapresión por la placa ungueal puede causar expansión del tejido distal poco resistente por lo cual el borde distal de la placa ungueal nuevamente crecido puede ser fijado en el crecimiento ilimitado del lecho ungueal subyacente (hipertrofia de la capa córnea).¹³

3.5. USO DE QUERATOLITICOS EN EL TRATAMIENTO LOCAL.

Ya se había hecho mención anteriormente que las queratinas son proteínas muy insolubles del tipo albuminoideo, para separar las proteínas queratínicas es necesario convertirlas en formas solubles. Su cadena polipeptídica fundamental posee conformación de α -hélice orientada hacia la derecha, estabilizada por puentes de hidrógeno. Además, en grado variable, se presentan uniones cruzadas constituidas por enlaces de disulfuro.⁴⁷

Al grupo de los queratolíticos pertenece una serie de sustancias capaces de desintegrar la capa córnea e inhibir la proliferación de la capa germinativa. De ahí que provocan la caída de la capa córnea o reducen su espesor anormal, tratándose de sustancias irritantes energéticas.^{20,28} Generalmente se trata de agentes reductores que rompen los enlaces de disulfuro (S-S) como son los compuestos con

grupos -SH, los cuales reducen la queratina.^{10,47}

Existen varias sustancias queratolíticas, sin embargo, dichas sustancias estan enfocadas a una aplicación sobre la queratina de la dermis, más no sobre la de las uñas, ejemplo de estas tenemos a Propilénglicol, Urea, Acido salicílico, Fenol, etc. Dada la diferencia entre la queratina de la dermis para con la de las uñas, no todas las sustancias anteriores podrían servir como queratolíticos de uñas.²⁸ En México se ha usado extensamente en onicomcosis a la Urea.⁴ Aunque recientemente se ha introducido el uso de enzimas, como es el caso de la Papaína.⁴⁶

Estas sustancias actúan solubilizando la queratina, desintegran la molécula, como es el caso del Acido salicílico, Propilénglicol. Un mecanismo general que se describe es que rompen los enlaces hidrógeno de la queratina, fomentando la disolución de la queratina. La Urea además de tener la propiedad anterior, posee una acción humidificante, ayudando al desprendimiento de la capa córnea más fácilmente.²⁸

El Acido salicílico puede solubilizar las proteínas de la superficie celular que mantienen el estrato córneo intacto, ocasionando así la descamación de residuos queratóticos, posee una acción directa sobre la queratina, con desintegración de la molécula. Es sumamente irritante, siendo queratolítico en concentraciones de 3 a 6 % (para piel). Si su concentración es mayor de 6 % puede destruir los tejidos. El excipiente que se utiliza para su aplicación puede ser una pomada, una pasta, un barniz (sustancias que se evaporan y dejan una película recubriendo la parte afectada) o un emplasto (excipiente

sólido que se ablanda a 37 °C y le sirve de soporte tela o hule). Se aconseja limitar la cantidad total de ácido salicílico aplicado y la frecuencia de aplicación. Su uso tópico puede estar relacionado con irritación local, inflamación aguda y aun formación de úlceras si las dosis son elevadas. No se ha reportado su uso en uñas humanas.²⁸

La Urea es queratolítica. Su mecanismo de acción parece comprender alteraciones en la prequeratina y la queratina, que conducen a un aumento en su solubilidad. Puede romper los enlaces hidrógeno que mantienen intacto al estrato córneo. Como agente queratolítico se usa en concentración al 20 %, puede acompañarse con sensación de escozor desagradable que obliga a suspender su medicación. Principalmente se utiliza como queratolítico en enfermedades como ictiosis, hiperqueratosis de palmas y plantas, y actualmente se utiliza en onicomycosis.²⁸

Ejemplos de tratamientos antimicóticos que contienen sustancias queratolíticas reportadas, son :^{4,18}

Crema de Bifonazol con urea al 40%.

Itraconazol o Griseofulvina como antimicótico tópico, usando Urea

Se ha observado que con la crema de bifonazol el espesamiento de la uña disminuye siendo estos últimos resultados tan buenos como los realizados con la Griseofulvina y justifican consideraciones de terapia local combinada con remoción de la uña como una alternativa en el tratamiento sistémico, particularmente para la uña grande del pie.¹² En México, la segunda opción ha dado buenos resultados.⁴

La Papaina es una enzima proteolítica (3.4.22), endopeptidasa,

posee un grupo sulfhidrilo dentro de su sitio activo. el cual debe ser mantenido en la forma reducida para su actividad, esto es, actúa como agente reductor (acción sobre enlaces disulfuro), al igual que las sustancias queratolíticas anteriores.¹⁴

3.6. EFECTIVIDAD DE UN FARMACO ANTIMICOTICO.

Por último para determinar la efectividad de un fármaco antimicótico se utiliza el método usado por Zaias, marcando en la parte normal de la unión de las zonas sana y enfermas. Si el medicamento y la dosis son efectivos, se establece una barrera clínica a la invasión proximal del hongo; si no hay barrera, el hongo invadirá la parte marcada en la uña. En este caso de nuevo se marca la uña y se aumenta la dosis. Al mismo tiempo se puede marcar el borde proximal para medir el índice de crecimiento ungueal. Se ha visto que puede haber dosis efectivas inicialmente que luego dejan de serlo. La recaída puede deberse a un hongo quiescente o a reinfección; por tal motivo, es recomendable el uso de un antimicótico local después de la curación.

Estudios en México han demostrado la utilidad de los tratamientos combinados y la mejor dosis de los antifúngicos orales, siguiendo la técnica mencionada. Sin embargo, aún no se cuenta con el tratamiento ideal para resolverlas, a pesar de la gran frecuencia de estas onicopatías.⁹

II.4. CELDAS DE DIFUSION

4.1. CONCEPTOS.

Cuando se desea investigar "in vitro" el transporte de sustancias a través de una membrana implica la construcción de un sistema difusional adecuado. Se encuentran disponibles comercialmente, o bien están reportadas en la literatura, una gran variedad de sistemas difusionales que han sido desarrollados para usarse con membranas de diferente naturaleza, pero a pesar de que algunas se han diseñado para estudios similares, su diversidad es notable. Muchas de esas celdas están sujetas a errores en su diseño y producción.

Las celdas de difusión generalmente tienen elementos comunes: dos cámaras o compartimentos, uno conteniendo el agente activo (vehículo donador) y el otro conteniendo una solución receptor agitada (compartimento receptor), separadas por una pieza de piel u otro tipo de membrana. Variables tales como la temperatura, concentraciones del compartimento, muestreo, y agitación deben ser llevados a cabo sin sacrificio de la sensibilidad analítica.

Una clave concerniente en el uso de celdas de difusión es si hay agitación suficiente para prevenir concentraciones locales de fármacos y para minimizar capas de difusión estáticas. Así la meta es mantener condiciones "sink" durante todo el experimento.

La agitación o mezclado es más comunmente llevada a cabo por barras de agitación magnética; sin embargo, un diseño adecuado de agitación en celdas de difusión puede ser un problema en varios tipos de celda. El control de la temperatura ha sido realizado usando chaquetas de agua o simplemente sumergiendo la celda entera en baño de agua o de arena. Gradientes de temperatura pueden ser introducidos si el borde de la membrana no es adecuadamente calentado; tales gradientes de temperatura podrían ser agravados por sistemas de agitación incompleta del fluido. Sin embargo, pequeñas variaciones en la temperatura es posible que no afecten significativamente las velocidades relativas de penetración.^{19, 21}

4.2. CONCEPTO DE DIFUSION A TRAVES DE UNA MEMBRANA.

La difusión ésta definida como un proceso de transferencia de masa de moléculas individuales de una sustancia debido a un movimiento molecular al azar y asociado con un gradiente de concentración. El paso de materia a través de una barrera puede ocurrir por simple permeación molecular o por movimientos a través de poros y canales, lo cual depende a su vez del tamaño de las moléculas, del tamaño de los poros o canales, de la presencia de cargas electrostáticas tanto en la molécula como en la membrana.

Matemáticamente, la difusión queda definida por la primera Ley

de Fick:

$$J = \frac{dM}{s \cdot w \cdot dt} \quad (1)$$

con la cual se indica que la cantidad de materia (M) que fluye a través del grosor de una membrana (s), en la unidad de tiempo (t), es conocido como flujo (J). (Ecuación 1)

Cuando el flujo es proporcional al gradiente de concentración dC/dX , tenemos (Ecuación 2):

$$J = - D \frac{dC}{dX} \quad (2)$$

en la cual D es el coeficiente de difusión de un difusante (cm^2/s), C es la concentración (g/cm^3), X es la distancia de movimiento perpendicular a la superficie de la membrana (cm). Una condición importante es que se debe de asumir el estado estacionario, es decir, que la velocidad de entrada del difusante es igual a la velocidad de salida. Cuando el gradiente de concentración a través de una membrana es constante (dC/dX), significa que existe una relación lineal entre la concentración y la distancia.

La FIGURA 9 nos presenta un corte transversal de una celda de difusión en el que se observan dos compartimientos separados por una membrana S de grosor h .

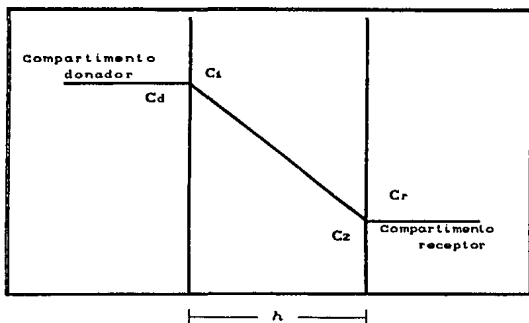


FIGURA 9. CORTE TRANSVERSAL DE UNA CELDA DE DIFUSION CON UNA MEMBRANA DE GROSOR h , QUE SEPARA A DOS SOLUCIONES. SE PRESENTA UN GRADIENTE DE CONCENTRACION DE UN DIFUSANTE. C_1 ES DIFERENTE DE C_d Y C_2 ES DIFERENTE DE C_r .

Y si las concentraciones del compartimento donador y del compartimento receptor son C_d y C_r respectivamente, la primera ley de Fick puede ser escrita (ECUACION 3):

$$J = \frac{dM}{S dt} = D \frac{C_1 - C_2}{h} \quad (3)$$

en la cual $(C_1 - C_2)/h$ es aproximado a dC/dX . La concentración C_1 y C_2 , que son concentraciones de la membrana no son conocidas generalmente, pero pueden ser reemplazadas por el coeficiente de partición (k) multiplicado por la concentración C_d o por C_r . El coeficiente de distribución o partición, esta dado por (ECUACION 4):

$$K = \frac{C_1}{C_d} = \frac{C_2}{C_r} \quad (4)$$

entonces si sustituimos la ECUACION 4 en la ECUACION 3:

$$\frac{dM}{dt} = \frac{DSK (C_d - C_r)}{h} \quad (5)$$

si se mantienen condiciones "sink" en el compartimento receptor, entonces $C_r = 0$,

$$\frac{dM}{dt} = \frac{DSK C_d}{h} = PSC_d \quad (6)$$

en el cuál:

$$P = \frac{D k}{h} \quad (\text{cm/seg}) \quad (7)$$

siendo P el coeficiente de permeabilidad, tiene unidades de velocidad

lineal.

En algunos casos no es posible determinar D , K o h , independientemente para calcular el valor de P . Uno puede entonces obtener a P de graficar M vs. t (Ecuación 8):

$$M = PSC_d t \quad (8)$$

asumiendo que C_d permanece relativamente constante en todo el tiempo.

Muchas veces se presentan casos como el de la FIGURA 10, en la cual se observa al inicio una figura convexa sobre el eje de tiempo para después mostrar una tendencia lineal.

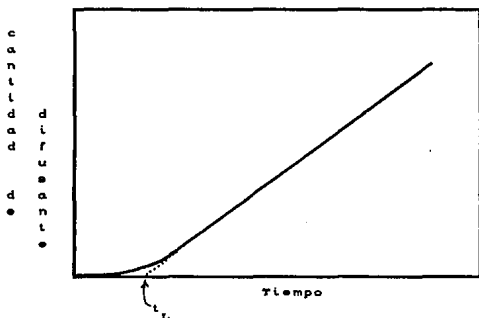


FIGURA 10. SE PRESENTA UN GRAFICO QUE REPRESENTA LA CANTIDAD DE UN FARMACO A PASANDO A TRAVES DE UNA MEMBRANA INERTE COMO UNA FUNCION DEL TIEMPO. SE PUEDE APRECIAR UN ESTADO ESTACIONARIO Y UN ESTADO NO ESTACIONARIO. t_L ES EL TIEMPO LAG.

Esta parte convexa de la curva inicial es un estado no estacionario. Tiempo después, la velocidad de difusión es constante, la curva es esencialmente lineal, y entonces el sistema se encuentra en un estado estacionario. Cuando la porción de la línea del estado estacionario es extrapolada a el eje de tiempo, el punto de intersección se conoce como el tiempo Lag, t_L . Este es el tiempo requerido para que un penetrante pueda establecer un gradiente de concentración sobre la membrana desde un compartimento donador a un compartimento receptor.

Por lo tanto, si consideramos a t_L , la ecuación se queda:

$$M = \frac{SDKc_d}{h} (t - t_L) \quad (9)$$

y el tiempo lag (t_L) esta dado por

$$t_L = \frac{h^2}{8D} \quad (10)$$

Esta última relación (10) provee un medio para calcular el coeficiente de difusión. ^{81,82}

4.3. CLASIFICACION DE LAS CELDAS DE DIFUSION.

Aún cuando las celdas son muy diversas se pueden clasificar con

base en su similitud o disimilitud del tamaño del compartimento y geometría. A causa de la idiosincrasia asociada con la ubicación de la membrana, es posible una subclasificación de los sistemas conforme a la colocación de la membrana, es decir, horizontal y vertical.

4.3.1. Celdas de difusión horizontales.

Las celdas de difusión horizontales usualmente comprenden dos cámaras o compartimentos: donador, Cd y receptor Cr. El primero contiene al difusante en solución y el segundo a la solución receptora. Estas dos cámaras están separadas por una membrana, como ya se había mencionado anteriormente. La parte superior de ambos compartimentos puede estar abierta o cerrada.

Uno de los problemas con este tipo de celdas es obtener una agitación adecuada. El contenido de una o ambas cámaras puede ser agitado para asegurar la dispersión adecuada de las moléculas del fármaco y para minimizar las capas de difusión estáticas, una de las ventajas en este tipo de celdas es que la agitación puede obtenerse utilizando una barra de agitación magnética o bien utilizar una propela adaptada a un agitador que permita alcanzar la velocidad de agitación deseada. Otro problema que puede encontrarse es la formación de burbujas de aire sobre la superficie de la membrana, sobre todo a temperaturas elevadas, lo cual puede ser controlado con una agitación adecuada.

Este tipo de celdas es posible subclasificarlas en celdas de difusión horizontales estáticas y de flujo continuo. La diferencia es que en la segunda subclasificación la solución de la fase receptora va cambiando constantemente permitiendo mantener condiciones "sink" durante todo el experimento.¹⁹

4.3.2. Celdas de difusión verticales.

La medida de velocidades de permeación bajo condiciones similares a aquéllas encontradas "in vivo" requiere de un diseño de celda diferente. Las celdas de difusión vertical, por tanto, se conocen también como celdas de difusión diseñadas para imitar las condiciones "in vivo", aunque también pueden ser utilizadas para estudios "in vitro" principalmente para estudios de permeación y evaporación en piel.

Los sistemas que muestran condiciones semejantes a las encontradas "in vivo" son normalmente verticales con la cámara inferior diseñada para contener el fluido receptor. La cámara inferior es agitada o reciclada para procurar mantener condiciones "sink" durante todo el experimento. Una ventaja de los diseños de celdas verticales es la capacidad para variar la naturaleza del vehículo donador. Una capa de material puede ser aplicada por evaporación del disolvente; ungüentos, pastas, membranas sintéticas en vez de piel natural, y dispositivos transdermales pueden ser estudiados.

Condiciones atmosféricas (por ejemplo, humedad) pueden ser controladas en estas celdas. Tratamientos secuenciales, tales como pretratamientos con un aumento seguido por deposición de un fármaco, es fácilmente alcanzado usando celdas verticales. Es también posible manejar experimentos de dosis finitos e infinitos. Dentro de este tipo de celdas se conocen dos tipos, al igual que en las celdas de difusión horizontales: estáticas y de flujo continuo.

Ambos tipo de celdas verticales presentan baja o incompleta agitación de la fase receptora y por otra parte el volumen de la misma fase receptora es algunas veces grande y requiere de un mayor muestreo de alícuotas por lo que se ve incrementado el tiempo de operación y error. En cuanto el volumen grande, este podría ser deseable para proveer condiciones "sink" en la fase receptora, sin embargo, en el flujo continuo tales volúmenes grandes son indeseables. La principal desventaja parece estar en la habilidad para agitar dichos volúmenes rápida y uniformemente.^{10,21}

4.4. DISEÑO DE LAS CELDAS DE DIFUSION.

El diseño y construcción de las celdas de difusión deben de atender las características de la membrana (naturaleza, grosor y tamaño disponible), tipo de formulación a utilizar, así como también contemplar las condiciones prevalecientes en el laboratorio.

así también lo relacionado al equipo y economía del laboratorio en donde se desee realizar una investigación con sistemas difusionales.

Utilizando la clasificación anterior se indican algunos de los criterios que se deben de considerar al diseñar una celda de difusión horizontal y vertical.⁴⁰

4.4.1. Diseño de celdas de difusión horizontal.

El diseño y construcción de este tipo de celdas es relativamente sencillo. Se deben de atender a las características que son deseables en cualquier celda de difusión y así construir celdas adecuadas para el estudio en donde sean requeridas. Generalmente los compartimentos se sujetan con tornillos o pinzas, aquí es necesario tomar en cuenta este aspecto en el diseño para no tener problemas de fugas de las soluciones de los compartimentos en donde es colocada la membrana. La mayoría de las veces se limita su uso para difusantes disueltos en vehículos líquidos.

Configuraciones de celda de difusión horizontal incluyen formas T y formas L. Muchas celdas de difusión están construidas en vidrio, también en latón y otros materiales plásticos. Por otro lado, la membrana puede ir soportada en una malla, a veces, existen problemas en el montaje de la membrana dada la geometría de la celda. El diseño horizontal de las celdas de difusión exponen a la membrana a disolventes en ambos lados durante todo el experimento llevando a

efectos de solvatación potencial. Los datos obtenidos en este tipo de cámaras son útiles si se reconocen las limitaciones de los diseños.^{19,18}

4.4.2. Diseño de celdas de difusión vertical.

El diseño de este tipo de celdas esta basado en la celda de difusión de Franz.¹⁷ Los diseños para estas celdas son más sofisticados y no tan fácilmente se pueden construir. Pueden construirse en vidrio, plástico o latón.^{17,19}

Este diseño variará dependiendo sobre el tipo de formulación bajo la cual se investigue. Otro aspecto por considerar en el diseño es el lugar en donde se realizarán las tomas de muestra del compartimento receptor.²¹

Existe un número de celdas diseñadas y probadas durante los últimos 25 - 30 años, de ahí que una variedad de celdas de difusión esten disponibles comercialmente. Sin embargo, muchas de estas celdas presentan defectos en su diseño. Siendo uno de estos la longitud del compartimento receptor, la cual muchas veces no permite la agitación adecuada de todo el volumen contenido en la fase receptora. Gummer diseñó celdas verticales de flujo continuo basandose en los errores existentes en las celdas de difusión comerciales, encontrando que los criterios que deben de tomarse en cuenta en este tipo de celdas deben de comprender lo siguiente: es esencial que el diámetro de la cámara

inferior sea tan grande como sea posible con el fin de agitar una altura de líquido mayor, es deseable también que el volumen de la cámara inferior sea igual o menor a 5.5 mililitros, el área superficial de la piel sea de 1 cm^2 y que la celda sea compatible con los aparatos de agitación existentes. Así, por lo que se ha dicho anteriormente, el punto crítico en el diseño de celdas verticales es el diseño de la cámara inferior, pues es importante mantener un diámetro grande en relación a la altura para favorecer la agitación, y junto con esto evitar la formación de burbujas de aire sobre la superficie inferior de la membrana, o bien utilizar disolventes desgasificados.²¹

II.5. DIFUSION A TRAVES DE LA UÑA HUMANA

Las propiedades de la placa ungueal son gobernadas por su construcción anatómica y sus propiedades fisicoquímicas. Como se ha mencionado la placa consiste de un laminado de hojas de células queratinizadas. Tiene menor contenido de lípidos y menor capacidad

para absorber agua que la piel. La queratina citoplasmática esta parcialmente cristalina y parcialmente amorfa. Seccionando la placa ungueal se observa una capa delgada de lípidos que separa a las células. Estos lípidos son residuos de las membranas celulares originales y aparentemente suplen por destitución intercelular a la membrana cubierta de gránulos durante la formación de la placa ungueal, en el primer nivel de organización.

Para un permeante dado, el principio común de transporte de masa puede darse en dos formas: un paso directamente a través de las unidades celulares apiladas una sobre otra que estan separadas por medio de la sustancia intracelular o bien puede fluir principalmente alrededor de los contenidos celulares por medio de una cadena intraconectada de los residuos lipídicos. La primera de esas posibilidades involucra pasar entre las cavidades de la queratina y, alternadamente, romper la estructura proteica, un proceso intercelular. Y la segunda se basa en el paso entre los lípidos de la uña, solubilizandolos, siendo totalmente extracelular. Se ha pensado que la placa ungueal puede actuar como un hidrogel concentrado. La permeabilidad esta influenciada por las características fisicoquímicas tanto de la uña humana como del difusante.

La uña tiene una hidrofobicidad más alta que la de la piel. Se ha establecido que la permeabilidad esta más orientada hacia lo termodinámico (asociado al incremento de la hidrofobicidad) que hacia lo cinético (tamaño molecular). Sobre un amplio rango de polaridad, la placa ungueal esta relacionada directamente a la permeabilidad

mientras que lo contrario es cierto para el estrato córneo. Se ha revisado la permeabilidad de compuestos alcanoles, la cual refleja un comportamiento general de la uña, sugiriendo que moléculas orgánicas de bajo peso molecular pueden ser permeables. Por lo que se ha propuesto que la permeabilidad de la placa ungueal aumenta al aumentar la polaridad de los permeantes, aunque también se han obtenidos buenos resultados cuando se tiene una polaridad muy baja, por lo que la permeabilidad aumenta con el incremento de la hidrofobicidad de los permeantes. Si esta suposición es cierta, entonces compuestos muy polares pueden ser sorpresivamente liberados fácilmente a través de la uña humana hacia un tejido básico. El hecho de que la Urea pueda ser usada para romper queratina y separar la placa ungueal de su lecho es una observación que soporta lo anterior.

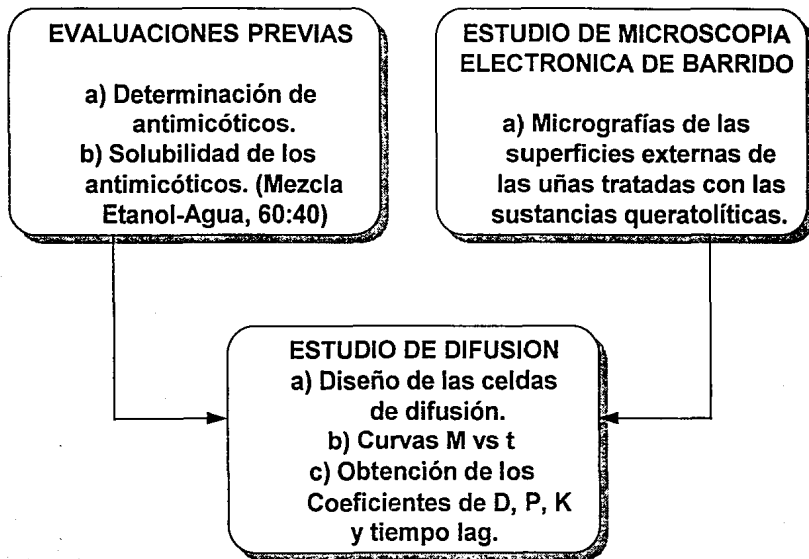
Ciertas propiedades tóxicas e irritantes de sustancias médicas obtenidas mediante pruebas realizadas sobre piel no pueden ser extrapoladas a la uña. Los criterios establecidos usados para la selección de fármacos para piel no son aplicables para las uñas, se ha establecido que también criterios fisicoquímicos gobiernan la selección de candidatos terapéuticos para tratar los desordenes de la uña humana.⁴⁵

CAPITULO IV

PARTE EXPERIMENTAL



DIAGRAMA DE FLUJO DE LA PARTE EXPERIMENTAL



INTRODUCCION

De acuerdo con el diagrama de flujo presentamos a continuación una breve explicación de como se estructuró nuestra investigación, se dividió en tres etapas.

Etapa I (Evaluaciones previas):

- * Se desarrolló y evaluó una técnica de cuantificación para antimicóticos tipo imidazol.
- * Se evaluó la influencia de las sustancias queratolíticas en la técnica de cuantificación de los antimicóticos.
- * Se determinó la solubilidad de los antimicóticos tipo imidazol en una mezcla Etanol-agua (60:40) a 37 °C.

Etapa II (Estudio por Microscopía Electrónica de Barrido).

- * Se observó la superficie externa de la uña humana a nivel microscópico.
- * Se evaluó el daño causado sobre la estructura ungueal al limar la superficie de la uña.
- * Se evaluó el daño causado sobre la estructura ungueal por acción de tres sustancias queratolíticas Urea, Papaina y Acido salicílico, en dos grupos de uñas: uñas con superficie sin limar y uñas con superficie limada.

Etapa III (Estudio de difusión).

De los resultados obtenidos en las Etapas I y II dependieron las condiciones establecidas en la Etapa III. De la Etapa I se necesitó que la técnica de evaluación fuera adecuada y que no interfirieran las sustancias queratolíticas en dicha técnica, así mismo se determinó la solubilidad de los antimicóticos. En la Etapa II se seleccionó a la sustancia queratolítica que presentó mayor efecto sobre la estructura ungueal, así también se revisó que tan útil es limar la superficie ungueal. Por lo que:

- * Se construyó una celda de difusión adecuada para el estudio.
- * Se realizó el estudio de difusión.

Una vez esbozada la forma en que se trabajó, presentamos a continuación la parte experimental.

IV. 1. MATERIALES Y EQUIPO

1.1. PRINCIPIOS ACTIVOS Y REACTIVOS.

- A) Nitrato de miconazol, Ketoconazol, Itraconazol (Janssen Farmacéutica) (USP).
- B) Acido salicílico. (G. R)
- C) Urea. (G. R)
- D) Papaína (USP).
- E) Verde de bromocresol. (G. R)
- F) Acido cítrico. (G. R)
- G) Acido clorhídrico. (G. A)
- H) Cloroformo. (G. A)
- I) Hidróxido de sodio. (G. R)
- J) Etanol absoluto. (G. R)

1.2. MATERIAL.

De vidrio

- Pipetas volumétricas de 0.5, 1, 2, 3, 4, 5, 10, 18 ml.
- Pipeta graduada de 1ml.
- Vasos de precipitados de 50, 100 y 250 ml.
- Embudos de separación de 125 ml.

General.

Soporte universal

Anillos

Pinza para sujetar juntas esféricas, de acero inoxidable (19/9).

1.2. EQUIPO.

General

Balanza analítica SAUTER Type 414/10

Potenciómetro CORNING, Mod. 7

Electrodo de calomel saturado y de vidrio, CORNING.

Vortex

De difusión

Celdas de difusión.

Parrilla. Thermolyne Mod. HP-A1915B

Baño de arena

Termómetro de mercurio (-10 a 400 °C)

De evaluación

Espectrofotómetro de doble haz, UV-Visible, HITACHI Mod. 100

Microscopio electrónico de barrido, JEOL (JSM-25SII).

Calibrador SCALA. Metro Méx. (1/20 mm).

IV. 2. METODOS

Es importante mencionar que durante toda la experimentación se utiliza como solvente una mezcla Etanol-Agua (60-40), excepto en los casos en los que se indique otro disolvente. Dicha mezcla es debida a que por una parte la uña humana absorbe agua permitiendo un mejor manejo o manipulación de la uña pues le quita rigidez a la misma y por otra es necesaria la presencia de etanol ya que las sustancias antimicóticas son insolubles en agua, al igual que el Acido salicílico.

2.1. EVALUACIONES PREVIAS (Etapa I).

Para poder llevar a cabo el estudio de permeabilidad de la uña humana fue necesario realizar una serie de evaluaciones previas por medio de las cuales se estableció la solubilidad de los antimicóticos, se cuantificó a los antimicóticos tipo imidazol, se evaluó si existe alguna interferencia de las sustancias queratolíticas con la cuantificación de los antimicóticos, así como también se incluye la parte correspondiente a la preparación de las soluciones.

2.1.1. Determinación de la solubilidad de los antimicóticos tipo imidazol.

La solubilidad de los antimicóticos tipo imidazol se determinó en una mezcla etanol-agua (60:40), a 37 °C, por triplicado. En 10 ml de la mezcla etanol-agua se adicionó una cantidad conocida del antimicótico agitando con un vortex, se mantuvo a 37 °C con agitación casual. después de 15 días se cuantificó al antimicótico (ver 2.1.2.) obteniendo los siguientes resultados de solubilidad:

TABLA 2. SOLUBILIDAD DE LOS ANTIMICOTICOS TIPO IMIDAZOL EN UNA MEZCLA ETANOL-AGUA (60:40) A 37 °C.

Antimicótico	Solubilidad (mg/ml)
Nitrato de miconazol	35.31
Ketoconazol	37.50
Itraconazol	0.81

2.1.2. Cuantificación de antimicóticos tipo imidazol.

Se desarrolló una técnica colorimétrica que consiste en una extracción múltiple (n=3) de un complejo amarillo formado entre el antimicótico tipo imidazol y el Verde de bromocresol en un sistema agua/cloroformo a pH 3.⁸

Se describe el procedimiento para la obtención del complejo amarillo Antimicótico-Verde de bromocresol (A-Vb):

1. Tomar una alícuota de la solución que contiene al antimicótico (solución estándar ó muestra).
2. Adicionar dentro de un embudo de separación de 125 ml, 15 ml de la solución de verde de bromocresol, 5 ml de buffer pH 3, alícuota muestra y 10 ml de cloroformo. Agitar el embudo durante 60 segundos.
3. Separar la fase clorofórmica que contiene al complejo amarillo y lavar dos veces la fase acuosa con cinco mililitros de cloroformo agitando cada una durante 30 segundos.
4. Recolectar los extractos clorofórmicos y diluir a 25 ml con cloroformo dentro de un matraz aforado. A ésta solución se le determina la absorbancia en el espectrofotómetro.

2.1.3. Obtención de espectros de absorción.

Se realizó un espectro de máxima absorción en la región ultravioleta de los antimicóticos disueltos en etanol para determinar la longitud de onda de máxima absorción de los antimicóticos y establecer su uso como técnica de cuantificación. Así mismo se realizó otro espectro de máxima absorción en la región visible para los complejos antimicótico-Verde de bromocresol.

1) Espectro de absorción en la región ultravioleta.

Se realizó un espectro de máxima absorción en la región ultravioleta para cada uno de los antimicóticos disueltos en etanol. Utilizando concentraciones de 12.0 mcg/ml para Nitrato de miconazol y Ketoconazol, y de 10 mcg/ml para Itraconazol. (FIGURA 11)

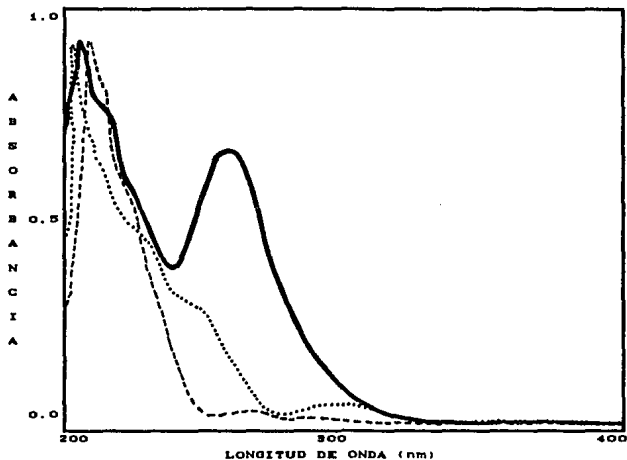


FIGURA 11
 ESPECTROS DE MÁXIMA ABSORCIÓN EN LA REGIÓN ULTRAVIOLETA PARA
 ---- NITRATO DE MICONAZOL,KETOCONAZOL (12 mcg/ml) E
 ——— ITRACONAZOL (10 mcg/ml), DISUELTOS EN ETANOL.

ii) Espectro de absorción en la región visible para el complejo amarillo Antimicótico tipo imidazol-Verde de bromocresol.

Utilizando la técnica para la cuantificación de antimicóticos tipo imidazol (2.1.2), se formaron los complejos coloridos para cada uno de los antimicóticos y se obtuvieron los espectros de máxima absorción en la región visible para cada complejo A-Vb. (FIGURA 12)

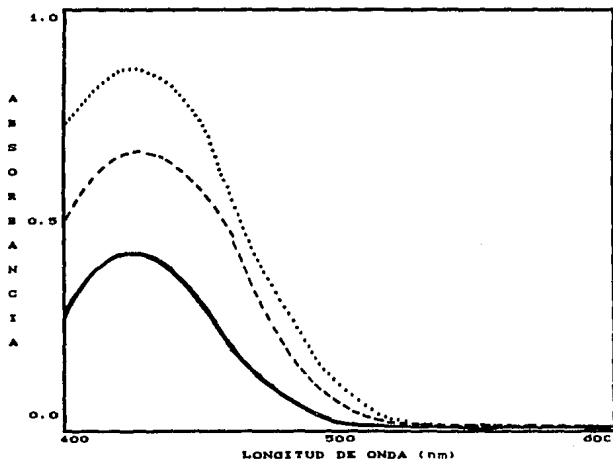


FIGURA 12
ESPECTROS DE MÁXIMA ABSORCIÓN EN LA REGIÓN VISIBLE PARA
---- NITRATO DE MICONAZOL-VERDE DE BROMOCRESOL (13 mcg/ml)
.....KETOCONAZOL-VERDE DE BROMOCRESOL (13 mcg/ml)
—— ITRACONAZOL-VERDE DE BROMOCRESOL (50 mcg/ml)

Se determinó la longitud de onda de máxima absorción para cada uno de los complejos amarillos formados en fase clorofórmica a partir de los espectros de máxima absorción anteriores.

De esta forma la longitud de onda de máxima absorción (λ_{max}) determinada para cada complejo fué de:

	λ_{max}
Nitrato de miconazol-Verde de bromocresol	422 nm
Ketoconazol-Verde de bromocresol	420 nm
Itraconazol-Verde de bromocresol	420 nm

De acuerdo con los espectros de máxima absorción, no es posible cuantificar a los antimicóticos tipo imidazol en la región ultravioleta, pues como podemos observar en la FIGURA 11 las zonas que presentan los picos de mayor absorbancia no están bien definidos y en suma están muy cercanos al límite inferior de la región ultravioleta (200 nm), lo cual no es muy adecuado desde el punto de vista analítico. La única excepción podría ser para el Itraconazol, que presenta un pico de absorción bien definido en 360 nm. Por el contrario, los espectros de máxima absorción obtenidos en la región visible debidos al complejo amarillo, A-Vb, si nos permiten la cuantificación adecuada de los antimicóticos.

2.1.4. Preparación de soluciones para la elaboración de las curvas de calibración.

Para cuantificar a los antimicóticos tipo imidazol se utilizó la técnica indicada en el punto 2.1.2.

Las soluciones reactivas preparadas en medio acuoso son Buffer de Citratos-HCl (pH 3) y Verde de bromocresol (10^{-4} M).

Se prepararon soluciones estándar de Nitrato de miconazol y de Ketoconazol, siendo para ambas el mismo procedimiento. Se disolvieron 50 mg del antimicótico en 50 ml de etanol. De esta solución se tomaron 15 ml, se agregaron dentro de un matraz aforado de 100 ml, adicionando 25 ml de etanol y 60 ml de agua destilada. Esta última solución fue la que se utilizó para elaborar las curvas de calibración, de la cual se tomaron alícuotas con concentraciones de 3, 6, 9, 12, 15 y 18 mcg/ml para Ketoconazol y en el caso de Nitrato de miconazol se realizó un punto extra con una concentración de 21 mcg/ml.

Con respecto a la solución estándar de Itraconazol, se tomaron 80 mg de Itraconazol y se disolvieron en 100 ml de etanol, a partir de esta solución se tomaron directamente las alícuotas para la curva de calibración con concentraciones de 32, 64, 96, 128, 160, 192 mcg/ml.

2.1.5. Elaboración de curvas de calibración.

Se prepararon siete sistemas para el Nitrato de miconazol y seis para el Ketoconazol e Itraconazol. Todo se realizó por triplicado, en

dos días diferentes con dos analistas. El análisis estadístico realizado se muestra en el Apéndice B.

Las concentraciones del complejo Antimicótico-Verde de bromocresol para Nitrato de miconazol y Ketoconazol fueron 3.0 - 21.0 y 3.0 - 18.0 mcg/ml, respectivamente. Mientras que para Itraconazol las concentraciones fueron de 32.0 - 192.0 mcg/ml.

Se utilizó un blanco reactivo y las lecturas de los valores de absorbancia se realizaron a la longitud de onda correspondiente para cada complejo.

Los valores de absorbancia obtenidos para las curvas de calibración se resumen en las tablas siguientes, en donde se relaciona la concentración con la absorbancia promedio (A_{med}), así mismo se presenta el coeficiente de variación para cada concentración.

(TABLAS 3-8).

TABLA 3. RELACION ENTRE ABSORBANCIA MEDIA Y CONCENTRACION PARA LAS CURVAS DE CALIBRACION DE NITRATO DE MICONAZOL, DIA 1 Y DIA 2. ANALISTA 1.

DIA 1			DIA 2		
C (mcg/ml)	A_{med}	C V (%)	C (mcg/ml)	A_{med}	C V (%)
3.0024	0.0763	1.5127	3.0048	0.0763	1.9500
6.0048	0.2640	2.3704	6.0096	0.2220	2.5080
9.0072	0.3720	2.2004	9.0144	0.3296	2.2359
12.0096	0.5042	1.7661	12.0192	0.4680	2.2512
15.0120	0.6391	1.8889	15.0240	0.5813	2.6998
18.0144	0.7690	1.9841	18.0288	0.7407	1.0312
21.0168	0.9146	1.7674	21.0336	0.8953	2.5132

Lecturas realizadas con blanco reactivo.

TABLA 4. RELACION ENTRE ABSORBANCIA MEDIA Y CONCENTRACION PARA LAS CURVAS DE CALIBRACION DE NITRATO DE MICONAZOL, DIA 1 Y DIA 2. ANALISTA 2.

DIA 1			DIA 2		
C (mcg/ml)	Amed	C V (%)	C (mcg/ml)	Amed	C V (%)
3.0011	0.0666	1.5461	2.9975	0.0613	2.0897
6.0023	0.2683	0.4648	5.9950	0.2670	0.8091
9.0034	0.3783	0.5431	8.9925	0.3787	0.3297
12.0046	0.5203	0.3266	11.9900	0.5253	0.7961
15.0057	0.6246	0.1996	14.9875	0.6300	0.2592
18.0069	0.7760	0.2104	17.9850	0.7800	0.1046
21.0080	0.8993	0.1386	20.9825	0.8987	0.1387

Lecturas realizadas con blanco reactivo.

TABLA 5. RELACION ENTRE ABSORBANCIA MEDIA Y CONCENTRACION PARA LAS CURVAS DE CALIBRACION DE KETOCONAZOL, DIA 1 Y DIA 2. ANALISTA 1.

DIA 1			DIA 2		
C (mcg/ml)	Amed	C V (%)	C (mcg/ml)	Amed	C V (%)
3.000	0.1073	2.3447	3.036	0.0980	2.6997
6.000	0.3043	2.180	6.072	0.3257	2.1807
9.000	0.4856	2.5162	9.108	0.4960	2.4444
12.000	0.6027	2.4065	12.144	0.6383	1.9587
15.000	0.7547	2.3343	15.180	0.8017	1.9498
18.000	0.9063	2.2104	18.216	0.9450	1.6013

Lecturas realizadas con blanco reactivo.

TABLA 6. RELACION ENTRE ABSORBANCIA MEDIA Y CONCENTRACION PARA LAS CURVAS DE CALIBRACION DE KETOCONAZOL, DIA 1 Y DIA 2. ANALISTA 2.

DIA 1			DIA 2		
C (mcg/ml)	Amed	C V (%)	C (mcg/ml)	Amed	C V (%)
3.0028	0.1123	1.8292	3.0028	0.1080	2.7258
6.0053	0.3167	1.0735	6.0056	0.3297	0.2859
9.0079	0.4053	0.9936	9.0084	0.5010	0.4312
12.0106	0.6170	0.4771	12.0112	0.6237	1.3179
15.0132	0.7570	0.4314	15.0140	0.7900	1.5430
18.0159	0.9257	0.3672	18.0169	0.9413	0.8537

Lecturas realizadas con blanco reactivo.

TABLA 7. RELACION ENTRE ABSORBANCIA MEDIA Y CONCENTRACION PARA LAS CURVAS DE CALIBRACION DE ITRACONAZOL, DIA 1 Y DIA 2. ANALISTA 1.

DIA 1			DIA 2		
C (mcg/ml)	Amed	C V (%)	C (mcg/ml)	Amed	C V (%)
32.00	0.1713	2.6318	31.84	0.1593	2.6129
64.00	0.2930	2.7304	63.88	0.2850	2.1912
96.00	0.4757	2.2083	95.52	0.4570	1.7911
128.00	0.6067	1.6511	127.36	0.5850	1.6835
160.00	0.7460	1.6796	159.20	0.7280	2.0234
192.00	0.9033	1.5824	191.04	0.8967	1.7361

Lecturas realizadas con blanco reactivo.

TABLA B. RELACION ENTRE ABSORBANCIA MEDIA Y CONCENTRACION PARA LAS CURVAS DE CALIBRACION DE ITRACONAZOL, DIA 1 Y DIA 2. ANALISTA 2.

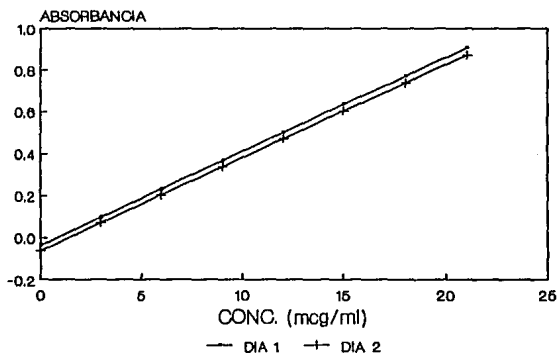
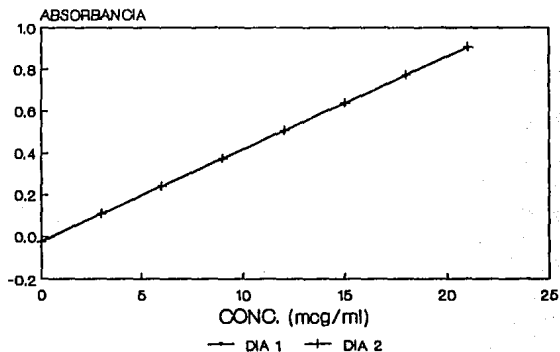
DIA 1			DIA 2		
C (mcg/ml)	Amed	C V (%)	C (mcg/ml)	Amed	C V (%)
32.00	0.1650	0.4948	32.00	0.1616	1.6235
64.00	0.2833	1.0120	64.00	0.2907	0.7069
96.00	0.4703	1.4455	96.00	0.4680	0.7605
128.00	0.5897	0.9219	128.00	0.5960	0.4939
160.00	0.7337	0.2317	159.01	0.7413	0.0635
192.00	0.8980	0.2406	191.01	0.9120	0.9848

Lecturas realizadas con blanco reactivo.

Se presentan a continuación los gráficos de las curvas de calibración para los tres antimicóticos, realizados por triplicado, dos días diferentes con dos analistas. En la TABLA 9 se indica el orden en que se presentan las gráficas de las curvas de calibración.

TABLA 9. ORDEN EN QUE SE PRESENTAN LAS CURVAS DE CALIBRACION PARA CADA ANTIMICOTICO, ELABORADAS EN DOS DIAS DIFERENTES CON DOS ANALISTAS.

GRAFICO	ANTIMICOTICO	ANALISTA
1	Nitrato de miconazol	1
2	Nitrato de miconazol	2
3	Ketoconazol	1
4	Ketoconazol	2
5	Itraconazol	1
6	Itraconazol	2

**ANALISTA 1
NITRATO DE MICONAZOL. DIAS 1 Y 2**FIGURA 3
CURVAS DE CALIBRACION.**ANALISTA 2
NITRATO DE MICONAZOL. DIAS 1 Y 2**FIGURA 4
CURVAS DE CALIBRACION.

**ANALISTA 1
KETOCONAZOL DIAS 1 Y 2**

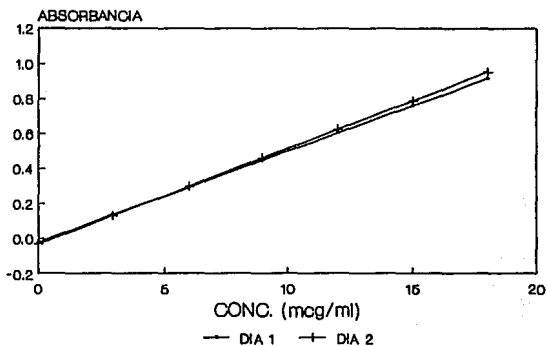


FIGURA 6
CURVAS DE CALIBRACION.

**ANALISTA 2
KETOCONAZOL DIAS 1 Y 2**

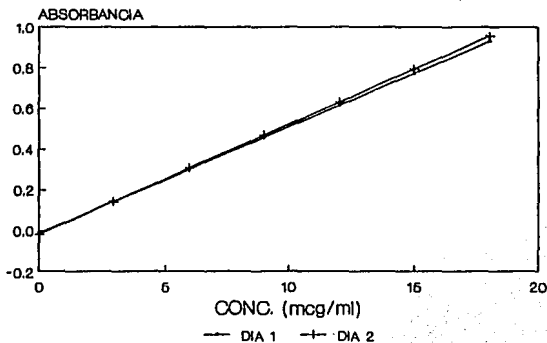
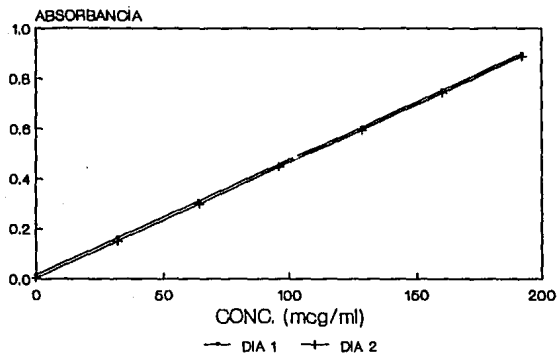
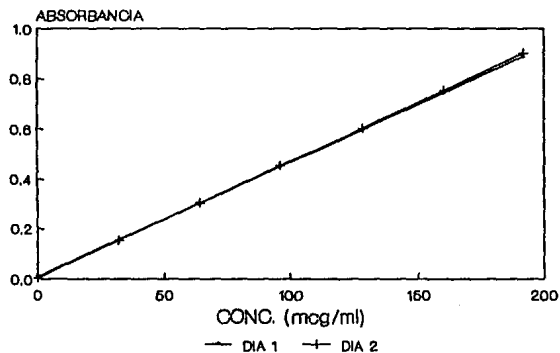


FIGURA 6
CURVAS DE CALIBRACION.

**ANALISTA 1
ITRACONAZOL DIAS 1 Y 2**FIGURA 7
CURVAS DE CALIBRACION.**ANALISTA 2
ITRACONAZOL DIAS 1 Y 2**FIGURA 8
CURVAS DE CALIBRACION.

2.1.6. Influencia de las sustancias queratolíticas en la cuantificación de antimicóticos tipo imidazol.

Se evaluó si las sustancias queratolíticas a utilizar (Urea y Acido salicílico, excepto Papaína), influyen en la técnica de cuantificación de los antimicóticos tipo imidazol. Con respecto a la Papaína, no se consideró debido a que precipita en las condiciones bajo las cuales se realizó la evaluación.

Se realizó lo siguiente:

Para cada sustancia se prepararon tres concentraciones por triplicado conteniendo al antimicótico (concentración fija), como disolvente se utilizó una mezcla de etanol-agua (80-40) y se mantuvieron durante 15 días a 37 °C. Las concentraciones utilizadas para Urea fueron de 20, 30 y 40 %, mientras que para Acido salicílico fueron de 10 y 20 %. Con respecto a los antimicóticos las concentraciones utilizadas fueron de 80 mg/ml para Nitrate de miconazol y Ketoconazol, mientras que para Itraconazol fue de 20 mg/ml. Determinando cuantitativamente al antimicótico (ver 2.1.2.) al inicio y término de los 15 días. Se manejaron como controles soluciones de los antimicóticos disueltos en la mezcla Etanol-Agua, bajo las mismas condiciones.

Durante la realización de esta evaluación nos percatamos que la solubilidad de los antimicóticos en la mezcla Etanol-Agua, aumenta cuando se encuentra presente Acido salicílico (ver TABLAS 2 y 10).

Como resultados preliminares se encontró que el Acido salicílico si interfiere en la técnica de cuantificación, por lo que se obtienen

valores en las lecturas de absorbancia más altos, dicha aportación se corrige con un blanco reactivo preparado con Acido salicílico. Es necesario mencionar que el Acido salicílico reacciona químicamente con el Ketoconazol e Itraconazol, siendo esta una reacción colorida (color vino).

Con respecto a la Urea no se encontró ninguna interferencia en la técnica de cuantificación ni reacción química con los antimicóticos.

En general disminuyó la cantidad del antimicótico al término de los 15 días, en todos los casos, aunque fue mínima. Dicha disminución se presentó de la siguiente forma (TABLA 10):

TABLA 10. VARIACION EN LA CONCENTRACION DE SOLUCIONES DE TRES ANTIMICOTICOS EN PRESENCIA DE SUSTANCIAS QUERATOLITICAS (37 °C) DESPUES DE 15 DIAS.

ANTIMICOTICO	C_i (mg/ml)	C_f (mg/ml)
Nitrato de miconazol	50	57.8
Ketoconazol	50	57.3
Itraconazol	20	19.8

C_i = Concentracion inicial.

C_f = Concentracion final.

2.2. ESTUDIO POR MICROSCOPIA ELECTRONICA DE BARRIDO DE LA UÑA HUMANA (ETAPA II).

Con la finalidad de conocer la superficie externa de la uña humana y el grado en que se pueden afectar o dañar la misma en presencia de sustancias queratolíticas, se realizó un estudio utilizando un Microscopio Electrónico de Barrido.

Las uñas humanas utilizadas para este estudio fueron obtenidas de una misma fuente.

Se mencionó en las generalidades (Tratamientos de onicomcosis) que es recomendable limar la superficie de la uña antes de aplicar un tratamiento sobre la misma, de esto surge la necesidad de conocer que tanto influye limar la superficie ungueal, por lo que se optó por trabajar con dos grupos de uñas:

- i) Uñas humanas sin limar su superficie externa.
- ii) Uñas humanas con superficie externa limadas. En este caso, se limaron las superficies moderadamente (se quitó el brillo de la uña) en dirección perpendicular al crecimiento de las mismas con una lima para uñas.

Se fijaron controles para cada una de las uñas humanas partiendo por la mitad cada uña humana, sometiendo una mitad al tratamiento y conservando la otra mitad como su control.

Los dos grupos se sometieron a un tratamiento durante 4 días a 37 °C, en presencia de tres sustancias queratolíticas con las siguientes

concentraciones (p/v):

a) Papaina (Buffer de fosfatos)	15%
b) Acido salicilico	30%
c) Urea	40%

Al término del tratamiento se sacaron todas las uñas de las soluciones queratolíticas. Se dejaron secar durante un mes. Una vez secas se colocaron cada una en un portamuestras de bronce cilíndrico y se observaron al microscopio electrónico de barrido obteniéndose las micrografías.

2.3 ESTUDIO DE DIFUSION (Etapa III)

Para la realización de este estudio, primero, se construyeron las celdas de difusión, así mismo se tomaron los resultados obtenidos en las dos etapas anteriores. A continuación se indican las condiciones bajo las que se realizó el estudio, más adelante se explicará en que nos basamos para establecerlas.

2.3.1. Diseño de celdas de difusión.

Se indicó anteriormente las características necesarias que se requieren en un sistema de difusión. Para este estudio se diseñó la siguiente celda de difusión (FIGURA 18). Se trata de una celda horizontal estática. Se eligió este tipo de celda por su fácil construcción para su construcción se utilizaron matraz erlenmeyer de 50 ml, adaptándose en el taller de soplado de vidrio de la FESC-UNAM.

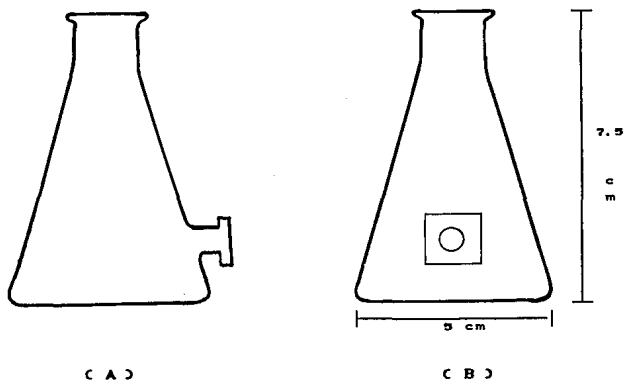


FIGURA 18

CELDA DE DIFUSION DISENADA PARA NUESTRO ESTUDIO
A) VISTA FRONTAL Y B) VISTA LATERAL.

Como se indica en la FIGURA 18, las porciones en las que se monta la membrana, o en nuestro caso a la uña humana, tiene esmerilada su superficie externa, con un diámetro interno de 7 mm y uno externo de 13 mm. Estas celdas permiten un control de temperatura ya que por su tamaño pueden ser colocadas dentro de un baño de arena y la agitación se puede obtener utilizando una propela de vidrio diseñada especialmente de acuerdo a las dimensiones del sistema.

2.3.2 Preparación de soluciones para el estudio de difusión.

i) Solución de papaina.

Se pesaron 0.450 gramos de papaina y se disolvieron en 3.0 ml de buffer de fosfatos pH 6.2.³²

ii) Solución de Nitrato de miconazol, Ketoconazol e Itraconazol.

Se pesaron 1.8, 1.125 y 0.024 gramos de Nitrato de miconazol, Ketoconazol e Itraconazol, respectivamente y se disolvieron en 30 ml de una mezcla Etanol/Agua (60:40).

iii) Solución de ácido salicílico.

Se pesaron 6 gramos de ácido salicílico y se disolvieron en 30 ml de una mezcla Etanol/Agua (60:40).

iv) Solución antimicótico-sustancia queratolítica.

Se disolvieron el Nitrato de miconazol y el Acido salicílico en 30 ml de la mezcla Etanol/Agua (60:40) en las cantidades ya mencionadas. Para Ketoconazol e Itraconazol esto no fué posible debido a la reacción química que presentan con el Acido salicílico.

2.3.3. Preparación y montaje de la uña humana como membrana dentro del sistema de difusión.

Se realizó el estudio de difusión utilizando uñas humanas de manos. El área de exposición de la membrana fue de 0.1963 cm^2

La uña humana fué soportada en rondanas de plástico, dejando expuesta un área central circular de 5mm a través de la cual la permeación fué medida. Se utilizó silicón para unir las.

Una vez realizado lo anterior, se colocó el dispositivo anterior entre las dos mitades de las celdas de difusión, uniendo de nuevo con silicón y sujetando ambas terminales con una pinza. (FIGURA 14). Cuidando que la superficie externa de la uña humana quedara del lado del compartimento donador (CD).

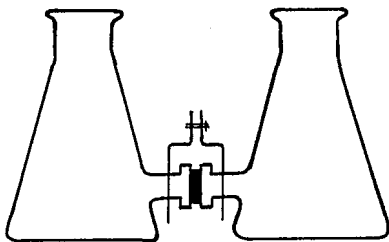


FIGURA 14
ESQUEMA DEL SISTEMA DE DIFUSION UNA VEZ COLOCADA LA UÑA HUMANA
ENTRE AMBOS COMPARTIMIENTOS.

Se dejó endurecer el silicón 24 horas, al término de las cuales se colocó el sistema difusional dentro de un baño de arena, con una temperatura de 37 °C. Se verificó que no se presentaran fugas de las soluciones colocadas en ambos compartimentos por donde se unen ambas celdas.

2.3.4. Descripción del estudio de difusión.

Las sustancias queratolíticas fueron seleccionadas una vez realizado el estudio de Microscopía Electrónica de Barrido (Etapa II). En base a esto, se utilizaron como sustancias queratolíticas Papaina y Acido salicílico y se limó la superficie externa de la uña humana. Por otra parte, dado que la papaina se desnaturaliza al entrar en contacto con etanol o los antimicóticos, es necesario utilizarla por separado.

Antes de establecer las condiciones de experimentación definitivas, se realizó una serie de pruebas preliminares con las cuales se fijaron el tiempo de los experimentos, verificando al mismo tiempo si las sustancias queratolíticas seleccionadas fueron las adecuadas. Estas pruebas se resumen a continuación en la TABLA 11.

TABLA 11. PRUEBAS DE DIFUSION PRELIMINARES VARIANDO LAS SUSTANCIAS QUERATOLITICAS Y LOS TRATAMIENTOS SOBRE LA UÑA HUMANA.

ANTIMICOTICO	UÑA	QUERATOLITICO	RESULTADO
Ketoconazol	Sin limar	Urea	N, 60 días
Itraconazol	y sin	Urea	N, 60 días
Nitrato de miconazol	tratamiento ^M	Urea/AS	N, 60 días
Ketoconazol	Limada	Urea	N, 60 días
Itraconazol	y sin	Urea	N, 60 días
Nitrato de miconazol	tratamiento ^M	Urea/AS	N, 60 días
Ketoconazol	Limada	Urea/AS ¹	N, 60 días /P, 30 días
Itraconazol	y con	Urea/AS ¹	N, 60 días /P, 30 días
Nitrato de miconazol	tratamiento ^M	Urea/AS	N, 60 días /P, 30 días

^M Papaína (15N), 24 h a 37 °C.

¹ Pretratamiento con Acido salicílico (20 N), 15 días a 37 °C.

AS = Acido salicílico.

N = Negativo, P = Positivo.

Las condiciones finales del estudio de difusión fueron:

1) Dentro del compartimento donador (Cd) se agregaron 3 ml de solución de papaína al 15 %, dejando así durante 24 horas. Al mismo tiempo que se agregaron dentro del compartimento receptor (Cr) 30 ml de una mezcla de Etanol/Agua (60:40) (Todo a 37 °C).

2) Una vez transcurridas las 24 horas se recolectó la mezcla de

se colocó la sustancia queratolítica y/o antimicótico de acuerdo a la

TABLA 12:

TABLA 12. FORMA EN QUE SE REALIZARON LOS ESTUDIOS DE DIFUSION.

ESTUDIO DE DIFUSION PARA	A. SALICILICO SOLO (20%) (A)	ANTIMICOTICO SOLO (B)	ANTIMICOTICO + A. SALICILICO (20 %) (C)
Nitrato de miconazol	-	-	Todo el estudio
Ketoconazol	15 días	15 días	-
Itraconazol.	15 días	15 días	-

Se realizo primero la parte (A) y enseguida la parte (B).

Lo anterior se realizó debido a la reacción existente entre Ketoconazol e Itraconazol con Acido salicilico. (2.1.6)

2.3.4. Toma de muestra del Compartimiento receptor (Cr)

Una vez que se adicionó la solución con el antimicótico tipo imidazol dentro del compartimento donador (Cd) del sistema de difusión se tomaron muestras de un mililitro del compartimento receptor (Cr) a intervalos de tiempo determinados cuidando de tomar la muestra en todos los casos en el mismo sitio y de agitar ligeramente la solución contenida en dicho compartimento. El volumen de la muestra tomada fué

repuesto por mezcla de Etanol-Agua nueva.

Se cuantificó la cantidad presente de antimicótico tipo imidazol en el compartimento receptor (Cr), utilizando la técnica descrita anteriormente.(2.1.2.)

CAPITULO V

RESULTADOS



En este capítulo se muestran los resultados experimentales obtenidos únicamente para las Etapas II y III, los resultados de la Etapa I ya fueron indicados en el capítulo anterior.

V.I. ESTUDIO POR MICROSCOPIA ELECTRONICA DE BARRIDO DE LA UÑA HUMANA.

Al término del tratamiento con sustancias queratolíticas se observaron las uñas humanas, presentando cada una un aspecto físico diferente (Prueba cualitativa de apreciación física). (TABLA 18)

TABLA 18. APRECIACION FISICA DE UNAS HUMANAS TRATADAS CON SUSTANCIAS QUERATOLITICAS (CUATRO DIAS, 37 °C), AL TERMINO DEL TRATAMIENTO.

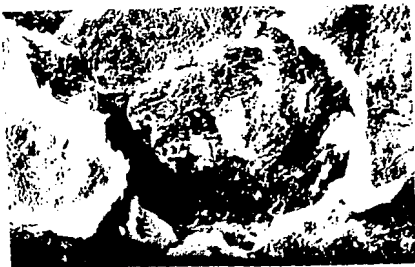
UNAS	QUERATOLITICOS	OBSERVACIONES
Sin limar	Control	Rígida, dura.
Limada	Control	Disminuye ligeramente la dureza.
Sin limar	Acido salicílico	Flexible, suave.
Limada	Acido salicílico	Se aumentan las características anteriores.
Sin limar	Urea	Flexible.
Limada	Urea	Aumenta su flexibilidad.
Sin limar	Papaína	Más suave y flexible que con Acido salicílico.
Limada	Papaína	Se ve acrecentado lo anterior.

Se presenta a continuación una serie de micrografías obtenidas de uñas humanas tratadas con sustancias queratolíticas (FIGURAS 15-21): Urea, Acido salicílico y Papaína, durante cuatro días a 37°C, obtenidas del Microscopio Electrónico de Barrido.

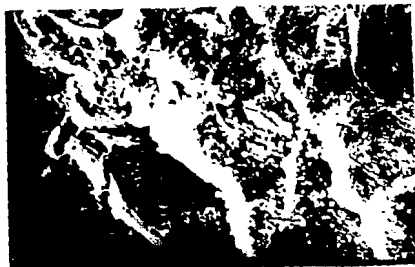
El orden en que se presentan tiene el fin de comparar los efectos que se originan en la superficie externa de la uña humana sin limar y la uña humana limada, para una misma sustancia queratolítica, junto con sus controles respectivos. Así la serie se inicia con las micrografías de Urea, seguidas de las micrografías de Acido salicílico y por último las micrografías de la Papaína.



FIGURA 15. MICROGRAFIA DE LA UÑA HUMANA SIN TRATAR.
(AMPLIFICACION 4500X)

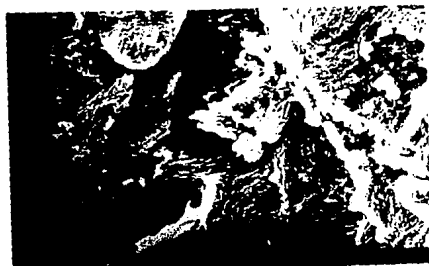


(A)



(B)

FIGURA 16. MICROGRAFIA DE LA SUPERFICIE EXTERNA DE LA UÑA HUMANA SIN LIMAR: A) CONTROL, B) TRATADA CON UREA (40%), CUATRO DIAS A 37 °c. (AMPLIFICACION 1500X)



(A)



(B)

FIGURA 17. MICROGRAFIA DE LA SUPERFICIE EXTERNA DE LA UÑA HUMANA LIMADA; A) CONTROL, B) TRATADA CON UREA (40%), CUATRO DIAS A 37 °C. (AMPLIFICACION 1500X)



(A)

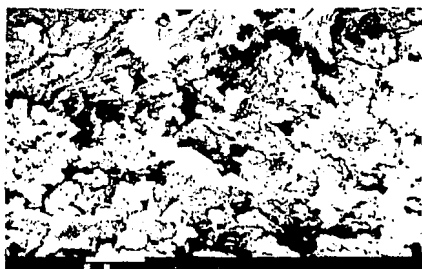


(B)

FIGURA 18. MICROGRAFIA DE LA SUPERFICIE EXTERNA DE LA UÑA HUMANA SIN LIMAR; A) CONTROL, B) TRATADA CON ACIDO SALICILICO (20%), CUATRO DIAS A 37 °C. (AMPLIFICACION 1500X)



(A)



(B)

FIGURA 10. MICROGRAFIA DE LA SUPERFICIE EXTERNA DE LA UÑA HUMANA LIMADA; A) CONTROL, B) TRATADA CON ACIDO SALICILICO (20%), CUATRO DIAS A 37 °C. (AMPLIFICACION 1500X)



(A)

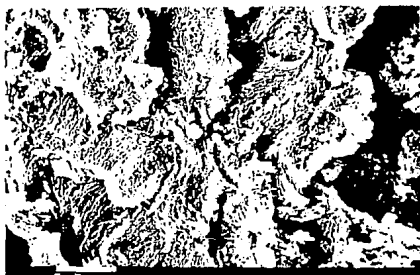


(B)

FIGURA 20. MICROGRAFIA DE LA SUPERFICIE EXTERNA DE LA UÑA HUMANA SIN LIMAR; A) CONTROL, B) TRATADA CON PAPAINA (15%), CUATRO DIAS A 37 °C. (AMPLIFICACION 1500X)



(A)



(B)

FIGURA 21. MICROGRAFIA DE LA SUPERFICIE EXTERNA DE LA UÑA HUMANA LIMADA; A) CONTROL, B) TRATADA CON PAPAINA (15%), CUATRO DIAS A 37 °C. (AMPLIFICACION 1500X)

Vamos a indicar las características encontradas en cada muestra. En la FIGURA 15 (ampliación mayor, 4500X) se puede apreciar de cerca la estructura ungueal observándose huecos. En las micrografías de las uñas control sin limar (FIGURAS 16a, 16a, y 20a) observamos escamas, cuya superficie se aprecia rugosa, existen alrededor de las escamas zonas oscuras, que asemejan cavidades, se observan también fragmentos pequeños, pocos restos celulares. En las micrografías de las uñas humanas control limadas (FIGURAS 17a, 19a y 21a), las escamas se aprecian fragmentadas, su superficie se ve rugosa, se aprecian claramente cavidades y fragmentos pequeños al igual que en las uñas sin limar, estos últimos en mayor cantidad. De acuerdo con las micrografías se puede observar en todas las uñas humanas control con sus superficies externas sin limar y limadas, la presencia de láminas celulares o escamas, también se observan huecos pequeños y en el caso de las uñas humanas limadas se observan fragmentos.

A continuación se indican las características observadas en las micrografías de las uñas humanas tratadas con sustancias queratolíticas, la comparación que se hace es con respecto a su control.

En la uña humana con superficie externa sin limar tratada con Urea, 40 % (FIGURA 16b), las escamas están ligeramente fragmentadas, los huecos se aprecian un poco más grandes. En lo que respecta para la uña humana con superficie externa limada (FIGURA 17b), la fragmentación es ligeramente más notoria, aumentando el número de huecos, el efecto es ligeramente superior al obtenido en la figura

anterior.

Para la uña sin limar tratada con Acido salicilico, 30 % (FIGURA 18b), la fragmentación de las escamas y los huecos son muy notorios. En la uña tratada de igual forma pero con la superficie externa limada (FIGURA 18c) se aprecian abundantes fragmentos pequeños y hay mayor número de huecos de un tamaño más grande. En comparación a la uña sin limar el efecto se ve muy potenciado.

Con la uña sin limar tratada con Papaína, 15 % (FIGURA 20b) se aprecia la fragmentación de las escamas y la presencia de mayor número de huecos. En la uña con superficie externa limada tratada con Papaína, 15 % (FIGURA 20c), es más notoria la fragmentación, así también el número de huecos es mayor y son más grandes. Al comparar ambas figuras es notoria la diferencia entre limar y no limar la superficie externa de la uña.

En general y con lo que respecta a las uñas humanas tratadas con sustancias queratolíticas sin limar se observan muy similares a las control con la variante que los huecos se notan un poco más grandes y las escamas están un poco fragmentadas. En cambio, para las uñas humanas limadas el número y el tamaño de los huecos es mayor, aunado a una mayor cantidad de fragmentos.

Para finalizar esta sección se muestra una tabla (TABLA 14) en la que se asignó un número, arbitrariamente, de acuerdo a los efectos observados en las micrografías originados por las sustancias queratolíticas sobre la superficie ungueal externa. A las muestras control se les asignó un valor de cero a partir del cual se evaluó a

las demás muestras y se les dió un valor según el efecto observado, esto se hizo con el fin de proporcionar una idea general de lo que se obtuvo experimentalmente.

TABLA 14. ASIGNACIÓN ARBITRARIA SEGUN EL EFECTO OBTENIDO POR LAS SUSTANCIAS QUERATOLITICAS SOBRE LA SUPERFICIE UNGUEAL EXTERNA SIN LIMAR Y LIMADA.

URA	QUERATOLITICO	EFECTO
Sin limar	Control	0
	Urea	1
	Acido salicilico	2
	Papaína	2
Limada	Control	0
	Urea	1
	Acido salicilico	2
	Papaína	2

V. I. ESTUDIO DE DIFUSION.

El estudio de difusión se realizó por duplicado para Nitrato de miconazol y Ketoconazol; y solo una vez para Itraconazol, con una duración de 13 y 15 días para los dos primeros, respectivamente; y de 60 días para el último. En el caso del estudio para Itraconazol, se

realizó una sola vez debido a dos motivos: no fue suficiente la cantidad del principio activo (Itraconazol) y el tiempo de experimentación fue muy largo, dos meses, esto último debido a la baja concentración utilizada (solubilidad muy baja en el disolvente utilizado). Las muestras del compartimento receptor (Cr) se tomaron cada 48 h para Nitrato de miconazol y Ketoconazol, para Itraconazol se tomaron muestras cada 5 días, el volumen de la muestra fue de un mililitro el cual fue repuesto con solución nueva.

Se muestran los resultados en la TABLA 15 para Nitrato de miconazol, TABLA 16 para Ketoconazol y TABLA 17 para Itraconazol. Se presentan las concentraciones, C (mcg/ml), presentes en el compartimento receptor (Cr) a intervalos de tiempo determinados, t (días) y considerando que el volumen en el Cr fue de 30 ml, se presentan también la cantidad, M (mg), presente en este volumen.

TABLA 15. RELACION ENTRE CONCENTRACION (C), CANTIDAD (M) Y EL TIEMPO (t) PARA NITRATO DE MICONAZOL, OBTENIDA PARA LA UNA HUMANA CON SU SUPERFICIE EXTERNA LIMADA Y TRATADA CON PAPAINA (15 M) 24 h, EN PRESENCIA DE ACIDO SALICILICO (20 M). REALIZADO POR DUPLICADO (27 °C).

EXPERIENCIA 1			EXPERIENCIA 2		
t (días)	C (mcg/ml)	M (mg)	t (días)	C (mcg/ml)	M (mg)
1	10.53	0.315	1	23.38	0.699
3	117.84	3.534	3	103.88	3.114
5	281.79	7.551	5	210.31	6.309
7	301.27	9.036	7	270.73	8.121
9	357.48	10.723	9	331.18	9.935
11	438.93	13.168	11	401.42	12.043
13	513.54	15.408	13	480.66	14.420

TABLA 16. RELACION ENTRE CONCENTRACION (C), CANTIDAD (M) Y EL TIEMPO (t) PARA KETOCONAZOL, OBTENIDA PARA LA UNA HUMANA LIMADA SU CON SU SUPERFICIE EXTERNA LIMADA, TRATADA CON PAPAINA (15 M), 24 h Y ACIDO SALICILICO (20 M), 15 DIAS. REALIZADO POR DUPLICADO (27 °C).

EXPERIENCIA 1			EXPERIENCIA 2		
t (días)	C (mcg/ml)	M (mg)	t (días)	C (mcg/ml)	M (mg)
3	27.23	0.817	3	36.28	1.088
5	41.81	1.258	5	55.82	1.650
7	61.93	1.858	7	92.56	2.776
9	74.34	2.380	9	112.87	3.386
11	98.81	2.967	11	130.65	3.919
13	105.24	3.157	13	150.90	4.677
15	127.57	3.827	15	181.98	5.519

TABLA 17. RELACION ENTRE CONCENTRACION (C), CANTIDAD (M) Y EL TIEMPO (t) PARA ITRACONAZOL, OBTENIDA PARA LA UNA HUMANA CON SU SUPERFICIE EXTERNA LIMADA, TRATADA CON PAPAINA (15 M), 24 h Y ACIDO SALICILICO (20 M), 15 DIAS. REALIZADO UNA SOLA VEZ. (37 °C)

EXPERIENCIA 1		
t (días)	C (mcg/ml)	M (mg)
30	22.06	0.672
35	25.74	0.724
40	29.42	0.841
45	33.10	0.932
50	36.78	1.133
55	40.47	1.263
60	44.14	1.346

El antimicótico fue cuantificable a partir del día 30, antes no se pudo cuantificar.

En las tres tablas el tiempo se considera a partir del momento en que se colocó la solución del antimicótico dentro del compartimento donador.

De acuerdo con el modelo matemático propuesto (ECUACION 8):

$$M = P S C_d t$$

S es el área expuesta de la uña humana = 0.1963 cm^2
 $C_d = 60 \text{ mg/ml}$ Nitrato de miconazol y 37.5 Ketoconazol
 0.8 mg/ml (Itraconazol)

utilizando esta ecuación se llevaron los datos a un gráfico, M vs. t. (GRAFICO 7 para Nitrato de miconazol, por duplicado; GRAFICO 8 para Ketoconazol, por duplicado; y GRAFICO 9 para Itraconazol). A partir de estos gráficos se obtuvo el valor de tiempo lag, t_L , para cada antimicótico extrapolando la línea hacia el eje de las "x".

Para obtener el valor del coeficiente de permeabilidad (P), utilizamos la ECUACION 7.:

$$P = \frac{D K}{h}$$

h es el grosor de la uña humana, valor promedio = 0.0275 cm

Así mismo podemos obtener los valores del coeficiente de difusión (D) y del coeficiente de partición (k) de las ECUACIONES 10 y 11:

$$t_L = \frac{h^2}{6D} \quad (10)$$

$$D = \frac{P h}{k} \quad (11)$$

NITRATO DE MICONAZOL

Curva M vs. t

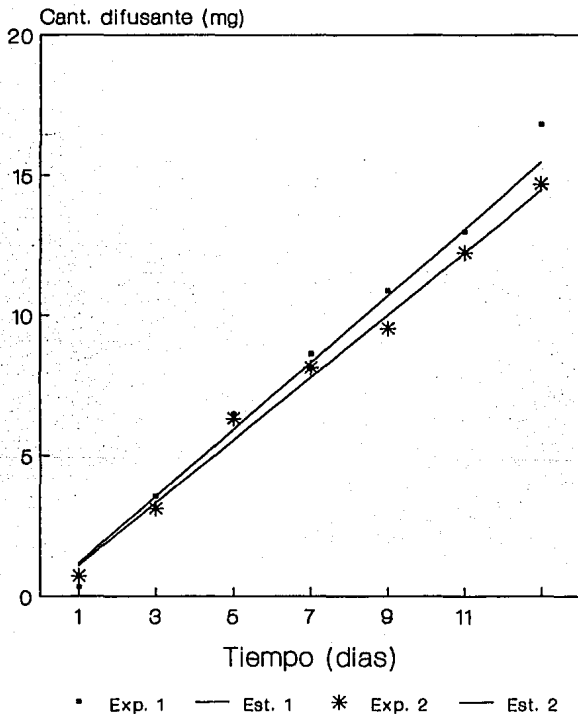


FIGURA 7. CURVA DE LA CANTIDAD DIFUNDIDA (M) CON RESPECTO AL TIEMPO (T) PARA NITRATO DE MICONAZOL, UTILIZANDO COMO MEMBRANA UÑA HUMANA CON SUPERFICIE EXTERNA LIMADA TRATADA CON PAPAÑA (45%) 24 h, EN PRESENCIA DE ACIDO SALICILICO (20%). (REALIZADO A 37 °C, POR DUPLICADO).

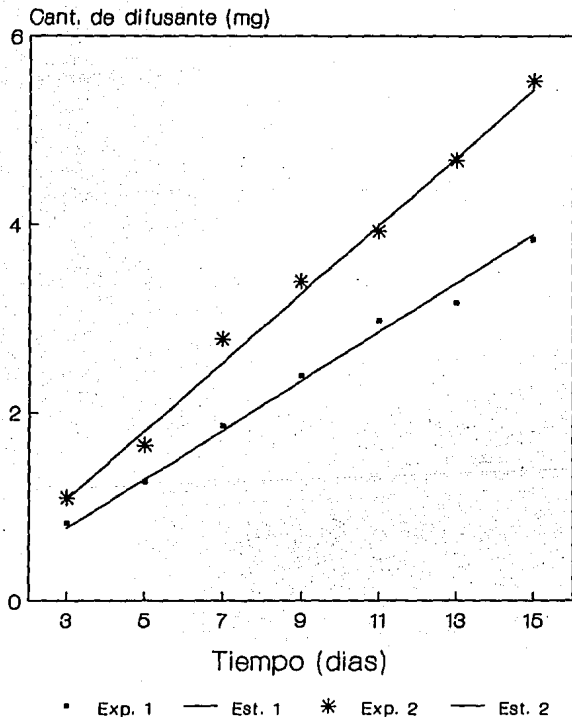
KETOCONAZOL
Curva M vs. t

FIGURA 8. CURVA DE LA CANTIDAD DIFUNDIDA (M) CON RESPECTO AL TIEMPO (T) PARA KETOCONAZOL, UTILIZANDO COMO MEMBRANA UÑA HUMANA CON SUPERFICIE EXTERNA LIMADA TRATADA CON PAPAINA (15 %), 24 h. Y ACIDO SALICILICO (20 %), 15 DIAS. (REALIZADO A 37 °C, POR DUPLICADO).

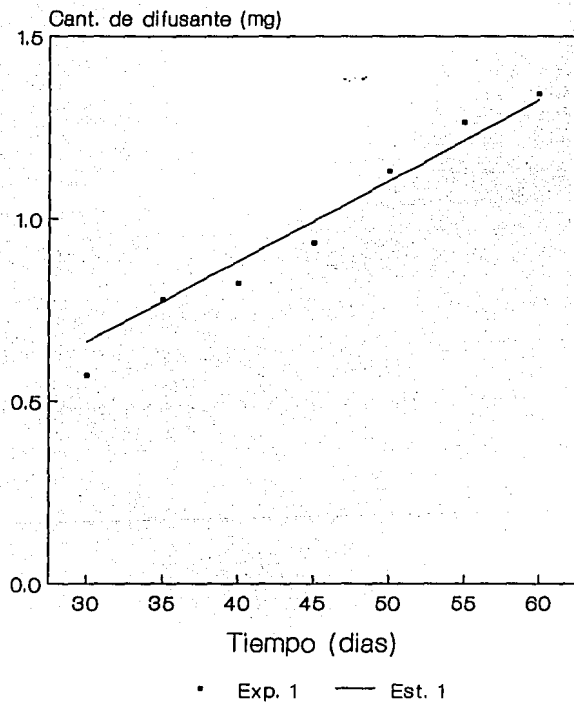
ITRACONAZOL
Curva M vs. t

FIGURA 9. CURVA DE LA CANTIDAD DIFUNDIRA (M) CON RESPECTO AL TIEMPO (T) PARA ITRACONAZOL, UTILIZANDO COMO MEMBRANA UÑA HUMANA LIMADA TRATADA CON PAPAINA (15 %), 24 h, Y ACIDO SALICILICO (20 %), 15 DIAS. (REALIZADO A 37 °C, UNA SOLA VEZ)

Con los valores obtenidos del coeficiente de permeabilidad (P), coeficiente de difusión (D), coeficiente de partición (k) y tiempo lag (t_L), para cada antimicótico, se construyó la TABLA 18.

TABLA 18. VALORES DE COEFICIENTE DE PERMEABILIDAD (P), COEFICIENTE DE DIFUSION (D), COEFICIENTE DE PARTICION (k) Y TIEMPO LAG DE LOS ANTIMICOTICOS TIPO IMIDAZOL OBTENIDOS EXPERIMENTALMENTE PARA LA UÑA HUMANA CON SUPERFICIE EXTERNA LIMADA, TRATADA CON PAPAINA (15M) Y ACIDO SALICILICO (20 M), A 37°C.

SUSTANCIA	P (cm/h) ($\times 10^{-3}$)	D (cm ² /h) ($\times 10^{-4}$)	t_L (h)	k
Nitrato de miconazol	3.925	3.041	0.572	0.416
Nitrato de miconazol	4.208	1.667	0.502	0.563
Ketoconazol	1.283	0.750	1.108	0.380
Ketoconazol	0.925	1.125	1.114	0.225
Itraconazol	5.858	2.167	0.799	0.879

La TABLA 18 nos presenta los valores promedio de los coeficientes de permeabilidad, difusión y el tiempo lag para cada antimicótico incluyendo los valores obtenidos por Walkers y colaboradores (45) para agua y etanol obtenidos de uñas humanas sin tratamiento.

TABLA 10. VALORES PROMEDIOS DE LOS COEFICIENTES DE PERMEABILIDAD (P), DIFUSION (D) Y TIEMPO LAG DE LOS ANTIMICOTICOS TIPO IMIDAZOL OBTENIDOS EXPERIMENTALMENTE PARA UÑAS HUMANAS CON SUPERFICIE EXTERNA LIMADA MODERADAMENTE, TRATADAS CON PAPAÑA (15 N) Y ACIDO SALICILICO (20 N), A 37 °C.

SUSTANCIA	P (cm/h) ($\times 10^{-3}$)	D (cm ² /h) ($\times 10^{-4}$)	t _L (h)
Nitrato de miconazol	4.067	2.354	0.538
Ketoconazol	1.104	0.937	1.112
Itraconazol	5.858	1.125	1.114
Agua*	16.504	1.917	0.248
Etanol*	5.800	0.958	0.470

*Valores experimentales para uñas sin tratamiento obtenidos por Walkers y colaboradores (49)

CAPITULO VI

DISCUSION



Al igual que en el capítulo anterior la discusión se efectuó únicamente para las Etapas II y III. Inicialmente se presenta la discusión para el *Estudio por Microscopia Electrónica de Barrido* (efecto de sustancias queratolíticas) y enseguida se presenta para el *Estudio de difusión* (permeabilidad de la uña humana), finalizamos con un enfoque práctico de lo que se obtuvo en este trabajo para el tratamiento de onicomiosis

a) Efecto de sustancias queratolíticas.

En general podemos hablar de dos efectos:

1. Efecto causado al limar la uña humana y,
2. Efecto causado por las sustancias queratolíticas.

1) Efecto de limar la superficie ungueal.

Con la uña humana sin limar se pudo conocer que a nivel microscópico la uña está formada por escamas, las cuales se encuentran aplastadas, la superficie de las escamas se aprecia rugosa lo cual es debido a la presencia de huecos pequeñitos, indicando con esto que se trata de una superficie no continua (FIGURA 15), las zonas oscuras que se observan alrededor de las escamas son pequeñas cavidades que separan levantando ligeramente una parte de la escama superior de la inferior. Cuando la uña humana es limada, lo que se está generando es

la fragmentación de las escamas superiores, algunas veces retirandolas, hecho que nos permite observar algunas cavidades mayores a las normalmente existentes, debajo de las escamas superiores, así como también algunos huecos se ven de un tamaño mayor con respecto al tamaño normal y por el mismo efecto de limar la superficie se encuentran fragmentos que es muy probable que se traten de lípidos junto con restos celulares.

2) Efecto de las sustancias queratolíticas.

Como ya se indicó en los resultados es apreciable un efecto sobre la superficie ungueal por acción de las sustancias queratolíticas.

A continuación se realiza una comparación de los efectos obtenidos por las sustancias queratolíticas sobre la estructura ungueal considerando las concentraciones utilizadas de las mismas. Empezamos con la Urea (40 %) a quien se utilizó con la concentración mayor en comparación a las otras dos sustancias, sin embargo, el efecto obtenido es muy pobre. En cambio, la Papaína (15 %), utilizada con la concentración más baja, en nuestro estudio, el efecto es mucho mayor. Con respecto al Acido salicílico (30 %), el efecto que tiene es muy similar al que presenta la Papaína. Así la única diferencia entre el Acido salicílico y la Papaína es la concentración utilizada, pues el primero requiere del doble de la concentración del segundo para obtener un efecto similar. Esto nos hace suponer que si se manejaran concentraciones iguales el efecto mayor lo tendría la Papaína, por lo

que decimos que se obtiene un mayor daño sobre la estructura de la uña humana con Papaina, seguida del Acido salicílico presentando el menor daño la Urea.

Para poder explicar como es que se tiene diferente grado de daño sobre la estructura de la uña humana es necesario referirse al mecanismo de acción de las tres sustancias queratolíticas. En general, son dos mecanismos, ambos involucran una reacción de reducción, en el primero la reacción es sobre el enlace puente de hidrógeno, lo cual es cierto para el Acido salicílico y Urea; en el segundo mecanismo la reacción se presenta sobre los enlaces disulfuro, dicho mecanismo es el que presenta la Papaina. Químicamente la estructura ungueal debida a su alta cantidad de sulfuro presenta formación de enlaces disulfuro que en comparación con la piel es mucho mayor, por lo que la estabilización de la queratina de la uña humana esta grandemente influenciada por los enlaces disulfuro, sin olvidar la importancia que ejercen los enlaces puente de hidrógeno. Ahora bien, esto explica en parte por que la Papaina provoca un daño mayor, pero aparte debemos de considerar la naturaleza de la misma, ya que como enzima posee una actividad mayor, pues debido a su capacidad selectiva puede romper enlaces en donde se encuentran aminoácidos básicos, por lo que su efecto se ve potenciado. El daño debido al Acido salicílico, cuya reacción es sobre los enlaces puente de hidrógeno, es provocada por el grupo carboxilo, grupo altamente reactógeno, no así para la Urea, que si bien también lleva a cabo una reacción muy parecida (actúa sobre puentes de hidrógeno), su grupo reactógeno no es superado por el grupo

del Acido salicílico.

Resumiendo, las micrografías obtenidas de las uñas humanas con su superficie externa sin limar y limadas tratadas con sustancias queratolíticas indican que dichas sustancias si afectan la estructura de la uña, rompiendo la queratina dando lugar a una fragmentación celular, originando huecos o cavidades mayores a las normales, con respecto a los fragmentos es muy probable que se trate de lípidos junto con restos celulares. Con estos resultados podemos ver que si bien macroscópicamente la uña humana no permite el paso de sustancias tan fácilmente debido a su estructura apretada, microscópicamente es posible observar que los huecos que presenta bien pudieran permitir el paso de algunas sustancias. El efecto de las sustancias queratolíticas se ve aumentando cuando se lima la superficie de la uña humana por lo que decimos que es adecuado que se lime la uña antes de aplicar cualquier tratamiento sobre la uña humana.

b) Permeabilidad de la uña humana.

A partir de los resultados anteriores se fijaron las características del estudio de difusión, aunado a lo encontrado en las evaluaciones preliminares (celdas de difusión, técnica de cuantificación, influencia de las sustancias queratolíticas sobre la técnica de cuantificación, etc.). De esta forma se decidió limar la superficie externa de las uñas, utilizar como sustancias

queratolíticas Acido salicílico y Papaína, descartando la Urea, así mismo y debido a la reacción del Acido salicílico con Ketoconazol e Itraconazol se cambiaron las condiciones de experimentación.

El análisis lo dividimos en tres secciones. Iniciamos la primera sección del análisis (D) retomando en forma general los valores de los coeficientes de difusión (D), permeabilidad (P), y de partición (k), por antimicótico, enseguida se hace una comparación entre los tres antimicóticos con la salvedad de que no se trabajó bajo las mismas condiciones, y por último, se realizó una comparación con los valores obtenidos por Walkers y colaboradores (49). La segunda sección (U) se refiere al análisis de las características tanto de la membrana como de las sustancias difusantes. Y en la tercera sección (UU) hablamos de un posible mecanismo de difusión de los antimicóticos a través de la placa ungueal.

4) Valores experimentales obtenidos.

Iniciamos esta parte del análisis retomando los valores experimentales obtenidos de los coeficientes de difusión (D), permeabilidad (P), partición (k) para cada antimicótico. (TABLA 18). En el proceso de difusión se requirió de tiempo para que el difusante penetrara la uña humana (tiempo lag, tL).

De entrada los valores del coeficiente de difusión (D) nos están indicando que efectivamente se está presentando el proceso de difusión para todos los antimicóticos. Ahora tomemos los valores del coeficiente de partición (K), podemos observar que son menores a la

unidad lo cual nos indica la preferencia de la sustancia permeante de permanecer en la solución acuosa-etanclica, más que en partición en el interior de la membrana, lo que indica la alta hidrofobicidad de la uña humana. Los valores de permeabilidad (P) obtenidos para todos los antimicóticos nos indican que la uña humana es permeable a los antimicóticos y que dicho proceso es posible por la presencia de sustancias queratolíticas, pues en los estudios realizados sin la presencia de dichas sustancias no se observó permeabilidad. Así los valores de permeabilidad (P) obtenidos por duplicado para Nitrato de miconazol son muy similares entre sí, lo mismo podemos decir de los valores obtenidos, por duplicado, para Ketoconazol. (TABLA 18).

Dado que las condiciones experimentales bajo las que se trabajó no fueron las mismas para los tres antimicóticos se presenta un pequeño análisis para cada uno de éstos.

La difusión para Nitrato de miconazol se ve facilitada por la presencia de Acido salicílico durante toda la experimentación. Esto sugiere que dada la presencia de Acido salicílico es muy probable que el fraccionamiento de la queratina se haya presentado constantemente, provocando más fragmentaciones, ayudando con este efecto a un aumento en el tamaño de los huecos, permitiendo de esta forma un mayor paso del antimicótico, este efecto no se presenta con los otros dos antimicóticos.

Con respecto a Itraconazol debemos de considerar que si bien estadísticamente los resultados obtenidos experimentalmente no fueron adecuados debido a que se realizó una sola vez, consideramos

conveniente reportarlos bajo esta salvedad. Así, notamos que aún cuando se realiza un tratamiento de 15 días con Acido salicílico y se utiliza una concentración baja en el compartimento donador (2.6 %), su permeabilidad es mucho mayor que para los otros dos antimicóticos. Su valor del coeficiente de partición es muy cercano a la unidad, lo que probablemente se deba a que es una molécula semipolar y además algo muy importante posee una mayor afinidad por la queratina de la uña humana. El hecho que presente un tiempo lag mayor en comparación a los otros dos antimicóticos es debido a la baja concentración en que fue utilizado (Cd).

En el caso del Ketoconazol y atendiendo las condiciones experimentales de trabajo los resultados fueron mucho menores en relación al Nitrato de miconazol. El hecho de haber obtenido un valor bajo del coeficiente de difusión nos sugiere una similitud con lo encontrado para piel con molecular polares, en las que el soluto enlazado puede ser razón de obtener coeficientes de difusión pequeños. En nuestro estudio de los tres antimicóticos utilizados, es el Ketoconazol el que presenta un polaridad mayor y su bajo valor del coeficiente de difusión podría probablemente deberse a un enlazamiento con la estructura proteica.

Si comparamos los valores de permeabilidad (P) obtenidos en esta investigación con los obtenidos por Walkers y colaboradores (45) (TABLA 19), es claro que nuestros resultados son menores.

u) Analisis en funcion de las características fisicoquímicas de la uña humana y de los antimicóticos.

Ya habíamos indicado que la difusión depende de la resistencia de paso de la molécula penetrante que está en función de la estructura molecular del fármaco y naturaleza química de la membrana, así también basándonos en que existe un aumento de la permeabilidad al aumentar la polaridad de los penetrantes y como base para una primera aproximación, se deben de considerar las características de la uña humana y las características de las sustancias permeantes, antimicóticos.

Con respecto a la uña humana se debe de tener en cuenta que su estructura es más apretada, contiene menor cantidad de lípidos, mayor cantidad de queratina y absorbe menor cantidad de agua, todo esto en comparación con la piel, por lo que su naturaleza es hidrofóbica, más alta que la de la piel. En cuanto a las sustancias permeantes se deben considerar la polaridad y el tamaño molecular (habilidad para difundir).

Llevemos ambas observaciones a nuestro experimento y notaremos que los antimicóticos son moléculas grandes, semipolares, esto es, ofrecen mayor resistencia para difundir, por lo que si nos basamos en la premisa que a mayor polaridad se tiene mayor permeabilidad, entonces podemos decir que la permeabilidad de los antimicóticos se ve impedida por su baja polaridad y por su tamaño molecular, sin poder establecer cual sería la primer limitante. Otro aspecto por considerar es que la permeabilidad también se presenta con moléculas poco

polares, pequeñas. Esta última observación no sería factible en nuestra investigación por que los antimicóticos tienen un tamaño molecular grande.

De acuerdo con nuestra investigación, la permeabilidad es ligeramente superada solamente cuando se ponen los antimicóticos en contacto con las sustancias queratolíticas que dan paso a la formación y aumento del tamaño de los huecos, de tal forma que, hay mayor espacio por donde puedan difundir los antimicóticos. Con esto la influencia del tamaño molecular de los antimicóticos puede ser descartada. Ahora observemos que cuando Walkers y colaboradores (45) realizan el estudio de difusión para Agua y etanol en la uña humana, sin ningún tratamiento, se trata de moléculas pequeñas y polares, por lo que ofrecen poca resistencia para difundir, lo que les permite obtener valores mayores en sus resultados en comparación a los que nosotros obtuvimos.

Reuniendo todo lo analizado podemos establecer que tanto la polaridad y el tamaño molecular de los difusantes así como la naturaleza de la membrana juegan un papel importante en el proceso de difusión ya que de estos depende que dicho proceso se presente. En nuestra investigación el proceso de difusión finalmente es limitado por la polaridad de los antimicóticos.

iii) Mecanismo de difusión de los antimicóticos a través de la placa ungueal.

Hablar de un posible mecanismo de difusión a través de la placa

ungueal es tomar en cuenta dos opciones: mecanismo de difusión que sigue la ruta de los lípidos, debido a la solubilización de lípidos y, el otro mecanismo se refiere al paso de las sustancias atravesando la placa ungueal, difundiendo entre las cavidades proteicas.

Cuando se realiza el estudio sin tratamiento con sustancias queratolíticas no se observa difusión, lo cual sugiere que no se presenta ninguno de los dos mecanismo descritos anteriormente o si se presentan es demasiado lento el proceso de difusión, pues se ve impedido por la estructura apretada de la placa ungueal, tamaño y polaridad de los antimicóticos. En cambio, cuando se realiza el estudio con el tratamiento de sustancias queratolíticas dicho proceso si se presenta, por lo que podemos establecer que al irse rompiendo la estructura proteica (queratina) se ve facilitada la difusión debido a un aumento en la cantidad y tamaño de huecos por los cuales pueden ir difundiendo los antimicóticos (FIGURA 15). De los dos mecanismos presentados anteriormente es el segundo mecanismo el que gobierna nuestro estudio seguido del mecanismo de solubilización de lípidos, pero en una proporción menor, sin contribución significativa, ya que no sería muy factible, pues si bien el etanol puede disolver solo ligeramente a los lípidos la proporción en que se encuentra no ayudaría mucho.

Walkers y colaboradores (45) propusieron que moléculas poco polares podrían seguir la ruta de los lípidos y así ser capaces de permear a la uña humana, lo que probablemente podría ser el caso del Itraconazol, pero sería arriesgado decir que dicha sustancia presenta

este mecanismo, pues no contamos con los elementos suficientes que nos ayuden a establecerlo, ya que la experimentación solo se realizó una sola vez

APLICACION DE NUESTRA INVESTIGACION EN EL TRATAMIENTO DE ONICOMICOSIS.

Es de suma importancia considerar que cuando se establece la onicomicosis la estructura de la uña humana se va modificando progresivamente, tornándose gruesa y porosa debida a la acción de los hongos que van degradando la queratina lo que va originado la formación de huecos. Se plantean dos posibilidades, una en función de lo reportado en la literatura y la segunda en función de lo obtenido en esta investigación: a) obtener efecto utilizando solamente a los antimicóticos (atacaría solamente a los hongos), y b) obtener efecto con los antimicóticos junto con las sustancias queratolíticas (se atacaría a los hongos facilitando la difusión del antimicótico), este efecto es favorecido si se lima la superficie externa de la uña humana infectada. Esta última opción es la que probablemente constituirá un tratamiento más rápido y efectivo, sin olvidar el interés y cuidados que el paciente tenga durante dicho tratamiento.

Con esta investigación se han abierto caminos de posteriores

estudios que sería importante poderlos desarrollar y explicar. Por ejemplo, la reacción colorida entre Ketoconazol e Itraconazol con Acido salicílico, y con respecto a esta investigación podría ser adecuado modificar algunas condiciones de experimentación como trabajar con uñas humanas infectadas por hongos, combinar las sustancias queratolíticas, utilizar otros antimicóticos, en el caso de Itraconazol utilizar disolventes en los que sea más soluble, reduciendo de esta forma el tiempo de experimentación.

Finalizando, la incidencia de onicomicosis en México es alta, a pesar de que existen los medicamentos, los tratamientos no suelen ser muy efectivos y es muy probable la reincidencia, efectos adversos y resistencia de los hongos frente a los fármacos utilizados. En una búsqueda de eliminar esta enfermedad con tratamientos cortos y efectivos se ha realizado este estudio en el que se ha encontrado que es posible la permeabilidad de antimicóticos tipo imidazol a través de la placa ungueal siempre y cuando se encuentren presentes o se realice un tratamiento con sustancias queratolíticas. Con esto se ha avanzado en el desarrollo de una forma farmacéutica para el tratamiento tópico de onicomicosis, pues se han estudiado las bases que permitan su continuación, de tal forma que se deberán de tomar en cuenta los criterios ya expuestos anteriormente en el diseño de la formulación.

CAPITULO VII

CONCLUSIONES



1. La técnica de cuantificación desarrollada resultó ser adecuada para la cuantificación de antimicóticos tipo imidazol, reuniendo las características necesarias que estadísticamente son aceptables. Potencialmente puede ser aplicable para la cuantificación de otros antimicóticos tipo imidazol.

2. La permeabilidad de la uña humana a antimicóticos tipo imidazol: Nitrate de miconazol, Ketoconazol e Itraconazol; es posible solo si se realiza un pretratamiento con sustancias queratolíticas: Papaina, Acido salicílico. Es muy probable que otros antimicóticos tipo imidazol presenten un comportamiento similar.

3. Las sustancias queratolíticas dañan la estructura de la uña humana, causando la formación de huecos mediante el fraccionamiento de la queratina, se observa un mayor efecto para la Papaina, seguida del Acido salicílico y por último, la Urea.

4. El mecanismo de difusión predominante es el paso de las sustancias penetrantes entre la estructura proteica, facilitado por las sustancias queratolíticas y limitado por la polaridad de las mismas sustancias. Por lo que a mayor polaridad de las sustancias permeantes mayor permeabilidad de las mismas para la uña humana.

5. La onicomicosis tiene una alta incidencia en nuestro país. Los tratamientos existen pero no son efectivos por lo cual se propone a través de esta investigación el desarrollo una forma farmacéutica con la posibilidad de obtener un tratamiento tópico corto y efectivo.

APENDICES

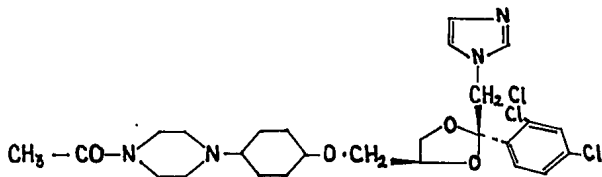


APENDICE A

CARACTERISTICAS FISICOQUIMICAS DE PRINCIPIOS ACTIVOS.

ITRACONAZOL (ORICONAZOL). $(C_{25}H_{30}Cl_2N_4O_4)$

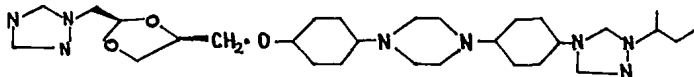
Polvo blanco cristalino, inodoro. Peso molecular 705.64, Punto de fusión 166.2 °C. Prácticamente insoluble en agua, ligeramente soluble en etanol, soluble en cloroformo. Es una base extremadamente débil. (pKa 3.7). Derivado triazol, antimicótico.²⁴



KETOCONAZOL. $(C_{22}H_{28}Cl_2N_4O_4)$

cis-1-acetil-4-[4-[2-(2,4-diclorofenil)-2-imidazol-1-ilmetil-1,3-dioxolan-4-ylmetiloxilfenil]piperazina.

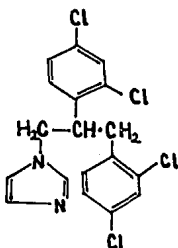
Peso molecular 531.4. Punto de fusión 148 °C. Polvo blanco, cristalino, inodoro. Prácticamente insoluble en agua, soluble en etanol, muy soluble en cloroformo. Derivado fenetilimidazol, antimicótico. ^{9,25,44}



NITRATO DE MICONAZOL. $(C_{18}H_{15}Cl_4NaO_4)$.

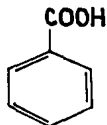
1-[(β (2,4-diclorobenciloxi)- β -(2,4-diclorofenil)etil)-imidazol mononitrato.

Peso molecular 479.1, punto de fusión 182 °C. Polvo blanco o casi blanco cristalino, inodoro. Muy ligeramente soluble en agua, ligeramente soluble en etanol y soluble en cloroformo. Tiene un pKa de 6.7. Derivado fenetilimidazol, antimicótico.^{9,23,44}



ACIDO SALICILICO $(C_7H_6O_2)$

El ácido salicílico forma cristales blancos, usualmente en agujas finas como un polvo cristalino blanco y esponjoso. Tiene un sabor dulzón seguido por uno pungente y es inodoro. Es soluble en agua, muy soluble en etanol. Es un ácido orgánico fuerte (pKa del grupo carboxilo es 3.0).



Es bacteriostático, impide la síntesis del ácido pantoténico, factor esencial de la reproducción microbiana, antiséptico, queratolítico. Es posible que ocurran reacciones urticarias, anafilácticas y de eritema multiforme en persona alérgicas a los salicilatos. Debera tenerse cuidado cuando se emplee este agente en extremidades de personas diabéticas o con enfermedad vascular periférica. ^{20,25,28,44}

PAPAINA

Peso molecular 20.7 D.

Se trata de una proteasa vegetal que se encuentra en las frutas del papayotero (*Carica papaya*).

La papaina es una enzima hidrolasa, (3.4.22.2) con actividad en los enlaces peptídicos (proteasa tiol). Esta formada por una sola cadena polipeptídica (Estructura α). Contiene un residuo simple de cisteína por molécula lo que le confiere una alta reactividad. La cisteína que tiene en su centro activo debe de ser mantenido en la forma reducida para su actividad. Contiene grupos -SH. El número de subunidades es uno. Es de amplia especificidad, actúa en aminoácidos básicos y azufrados.

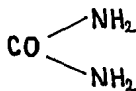
Condiciones óptimas de pH es de 6-7, aunque se ha reportado un pH óptimo de pH de 6.2. Por lo que presenta su actividad proteolítica en medios ácidos o básicos débiles.

Cuando el grupo -SH esta en forma de un disulfuro mezclado con la cisteína, la enzima exhibe bajos niveles de actividad proteolítica.

Es inhibida por reactivos bloqueadores de grupos sulfhidrilo, iones, metales pesados, derivados carbonilos, ácido ascórbico, aire y otros agentes oxidantes. En cambio los grupos -CN, -S, glutatión y Cisteína la activan. ^{6,10,14,46}

UREA $(\text{CH}_4\text{N}_2\text{O})$

Cristales incoloros o polvo cristalino blanco, casi inodoro de sabor salino. Fácilmente soluble en agua y etanol. No es liposoluble, ligero olor a amoníaco al humedecer.



En un vehículo compatible de crema o base de ungüento la urea tiene efecto suavizante y humectante sobre el estrato córneo. La urea se absorbe por vía percutánea. Se distribuye en forma predominante en el espacio extracelular y se excreta en la orina.

La urea incrementa el contenido hídrico del estrato córneo como consecuencia de las características higroscópicas de esta molécula natural. ^{20,25,28,44}

APENDICE B

ANALISIS ESTADISTICO PARA LA TECNICA DE CUANTIFICACION
DE LOS ANTIMICOTICOS TIPO IMIDAZOL.

Se presenta a continuación el análisis estadístico realizado a las curvas de calibración preparadas por triplicado en dos días diferentes con dos analistas.

Dado el intervalo de concentraciones utilizado para cada antimicótico, indicamos que la sensibilidad de la técnica utilizada es similar para los derivados benzimidazol, siendo mayor para el Nitrato de miconazol, así mismo la longitud de onda de máxima absorción varía para los tres antimicóticos. La formación del complejo y su extracción fue cuantitativa a pH 3. [■]

a) *Relación entre Absorbancia y concentración y linealidad del sistema*

Para evaluar la relación entre absorbancia y concentración en

las curvas de calibración se realizó un análisis de regresión.

Ecuación de regresión:

$$A = a + m C$$

en donde :

A = Absorbancia, a = Ordenada al origen, m = Pendiente de la recta,
C = Concentración.

Para cada uno de los antimicóticos se tienen las siguientes ecuaciones (TABLA 20).

TABLA 20. ECUACION DE REGRESION PARA LAS CURVAS DE CALIBRACION DE LOS ANTIMICOTICOS TIPO IMIDAZOL ELABORADAS DOS DIAS DIFERENTES CON DOS ANALISTAS.

DIA	ANALISTA 1	ANALISTA 2
Nitrate de miconazol		
DIA 1	A = -0.035 + 0.0449 C	A = -0.024 + 0.0442 C
DIA 2	A = -0.050 + 0.0444 C	A = -0.024 + 0.0444 C
Ketoconazol		
DIA 1	A = -0.019 + 0.0520 C	A = -0.013 + 0.0524 C
DIA 2	A = -0.050 + 0.0544 C	A = -0.018 + 0.0541 C
Itraconazol		
DIA 1	A = 0.017 + 0.0045 C	A = 0.009 + 0.0045 C
DIA 2	A = 0.004 + 0.0045 C	A = 0.005 + 0.0047 C

Dicho análisis indicó que los valores de los parámetros estadísticos establecidos obtenidos se encuentran dentro de lo especificado, es decir: $ICS < 0.0 < ICI$ (TABLAS 21 - 23), por lo que hay una recta en la familia de curvas que pasa por el intercepto, con 95% de confianza; el valor del coeficiente de regresión $r^2 = 0.99$, y el coeficiente de variación $CV \% > 3\%$, se cumple para todos los antimicóticos. Excepto para Nitrato de miconazol, Analista 1, día 2 del cual el intervalos de confianza no incluye al valor de cero.

Con lo que respecta a la linealidad del sistema, se realizó un ANOVA, resultando en todos los casos el valor de F experimental es menor al valor de F teórico ($F_{exp} < F_{teor}$), (TABLAS 21 - 23) por lo se establece que las curvas de calibración para los antimicóticos representa sistemas lineales.

TABLA 21. LINEALIDAD DEL SISTEMA Y ANALISIS DE VARIANZA PARA LAS CURVAS DE CALIBRACION DEL NITRATO DE MICONAZOL, EN DOS DIAS DIFERENTES. ANALISTA 1 Y ANALISTA 2.

ANALISTA 1

ANALISIS DE REGRESION		
Paramétro	DIA 1	DIA 2
* m	0.0451	0.0444
* b	-0.0381	-0.0606
* ICI, ICS	0.001, -0.071	0.047, -0.067
* r	0.9985	0.9985
* r ²	0.9972	0.9967
ANALISIS DE VARIANZA		
	DIA 1	DIA 2
F _{tab} (95N, 1, 4)	12.22	12.22
F _{exp}	11.94	9.81

ANALISTA 2

ANALISIS DE REGRESION		
Paramétro	DIA 1	DIA 2
* m	0.0440	0.0444
* b	-0.0209	-0.0239
* ICI, ICS	0.081, -0.076	0.084, -0.072
* r	0.9983	0.9980
* r ²	0.9966	0.9960
ANALISIS DE VARIANZA		
	DIA 1	DIA 2
F _{tab} (95N, 1, 4)	12.22	12.22
F _{exp}	4.94	2.48

m = PENDIENTE, b₀ = INTERCEPTO, r = COEFICIENTE DE DETERMINACION, r² = COEFICIENTE DE CORRELACION. ICI, ICS = INTERVALO DE CONFIANZA INFERIOR Y SUPERIOR. F_{exp} = VALOR DE F EXPERIMENTAL OBTENIDO. F_{tab} = VALOR DE F OBTENIDO DE TABLAS.

TABLA 22. LINEALIDAD DEL SISTEMA Y ANALISIS DE VARIANZA PARA LAS CURVAS DE CALIBRACION DEL KETOCONAZOL, EN DOS DIAS DIFERENTES. ANALISTA 1 Y ANALISTA 2.

ANALISTA 1

ANALISIS DE REGRESION		
Paramétro	DIA 1	DIA 2
* m	0.0520	0.0539
* b	-0.0190	-0.0297
* ICI, ICS	0.046, -0.084	0.044, -0.103
* r	0.9970	0.9966
* r ²	0.9941	0.9932
ANALISIS DE VARIANZA		
	DIA 1	DIA 2
F _{tab} (95N, 1, 9)	17.44	17.44
F _{exp}	16.92	16.54

ANALISTA 2

ANALISIS DE REGRESION		
Paramétro	DIA 1	DIA 2
* m	0.0524	0.0539
* b	-0.0136	-0.0180
* ICI, ICS	0.065, -0.067	0.083, -0.087
* r	0.9967	0.9966
* r ²	0.9934	0.9932
ANALISIS DE VARIANZA		
	DIA 1	DIA 2
F _{tab} (95N, 1, 9)	17.44	17.44
F _{exp}	1.21	3.80

m = PENDIENTE, b = INTERCEPTO, r = COEFICIENTE DE DETERMINACION, r² = COEFICIENTE DE CORRELACION. ICI, ICS = INTERVALO DE CONFIANZA INFERIOR Y SUPERIOR. F_{exp} = VALOR DE F EXPERIMENTAL OBTENIDO. F_{tab} = VALOR DE F OBTENIDO DE TABLAS. ^{1 2}

TABLA 28. LINEALIDAD DEL SISTEMA Y ANALISIS DE VARIANZA PARA LAS CURVAS DE CALIBRACION DEL ITRACONAZOL, EN DOS DIAS DIFERENTES, ANALISTA 1 Y ANALISTA 2.

ANALISTA 1

ANALISIS DE REGRESION		
Parámetro	DIA 1	DIA 2
* m	0.0049	0.0046
* b	0.0178	0.0041
* ICI, ICS	0.053, -0.017	0.037, -0.029
* r	0.9990	0.9991
* r ²	0.9981	0.9982
ANALISIS DE VARIANZA		
	DIA 1	DIA 2
F _{tab} (95%, 1, 8)	17.44	17.44
F _{exp}	5.05	4.41

ANALISTA 2

ANALISIS DE REGRESION		
Parámetro	DIA 1	DIA 2
* m	0.0046	0.0047
* b	0.0098	0.0029
* ICI, ICS	0.057, -0.055	0.041, -0.040
* r	0.9985	0.9990
* r ²	0.9971	0.9981
ANALISIS DE VARIANZA		
	DIA 1	DIA 2
F _{tab} (95%, 1, 8)	17.44	17.44
F _{exp}	3.54	2.05

m = PENDIENTE, b = INTERCEPTO, r = COEFICIENTE DE DETERMINACION, r² = COEFICIENTE DE CORRELACION.
 ICI, ICS = INTERVALO DE CONFIANZA INFERIOR Y SUPERIOR
 F_{exp} = VALOR DE F EXPERIMENTAL OBTENIDO.
 F_{tab} = VALOR DE F OBTENIDO DE TABLAS. ¹²

b) Límite de detección para las curvas de calibración.

Los límites de detección se obtuvieron interpolando el intervalo de confianza superior del intercepto (ICS, ver TABLAS 21 - 23) sobre la curva experimental de las curvas de calibración. Se presentan los valores promedios de los límites de detección para cada antimicótico (dos días) por analista. (TABLA 24). Como se puede apreciar los valores son muy similares presentan la misma tendencia para ambos analistas.

TABLA 24. LÍMITES DE DETECCIÓN PROMEDIO PARA LAS CURVAS DE CALIBRACION DE LOS ANTIMICOTICOS TIPO IMIDAZOL ELABORADAS POR DOS ANALISTAS.

ANTIMICOTICO	LÍMITES DE DETECCIÓN (mcg/ml)	
	ANALISTA 1	ANALISTA 2
Nitrato de miconazol	1.2180	1.0721
Ketoconazol	1.5081	1.4864
Itraconazol	8.9436	8.8174

c) Sensibilidad.

Para determinar el incremento mínimo de concentración medible que está definido por la pendiente del gráfico absorbancia concentración y del incremento mínimo de respuesta medible o la

desviación estándar de la respuesta variable. Se obtuvo mediante el uso de la ecuación siguiente:

$$Y = \frac{m}{S_{K/Y}}$$

m = pendiente de la curva de calibración.

Los valores obtenidos para la sensibilidad, presentan la misma tendencia y son muy similares para ambos analistas. (TABLA 25). El Nitrate de miconazol tiene una mayor sensibilidad e Itraconazol menor sensibilidad.

TABLA 25. SENSIBILIDAD PROMEDIO PARA LAS CURVAS DE CALIBRACION DE LOS ANTIMICOTICOS TIPO IMIDAZOL ELABORADAS POR DOS ANALISTAS.

ANTIMICOTICO	SENSIBILIDAD	
	ANALISTA 1	ANALISTA 2
Nitrato de miconazol	2.4997	2.3192
Ketoconazol	1.9874	2.0085
Itraconazol	0.3441	0.3185

d) Diferencia entre días para ambos analistas.

Para establecer la diferencia entre días para cada analista, se utilizó una prueba de paralelismo para pendientes e interceptos. Con la prueba de paralelismo para las pendientes se encontró en todos los casos que los valores de t experimental cae dentro del intervalo $(-t_{tab} < t_{exp} < t_{tab})$, (TABLA 26).

TABLA 26. PRUEBA DE PARALELISMO PARA LAS PENDIENTES. ANALISTAS 1 Y 2.

ANALISTA 1		
Nitrato de miconazol (195M,4)		-2.77 < 1.78 < 2.77
Ketoconazol (195M,3)		-3.18 < -2.27 < 3.18
Itraconazol (195M,3)		-3.18 < 0.00 < 3.18
ANALISTA 2		
Nitrato de miconazol (195M,4)		-2.77 < -2.31 < 2.77
Ketoconazol (195M,3)		-3.18 < -2.66 < 3.18
Itraconazol (195M,3)		-3.18 < -0.27 < 3.18

t = Valor de "t de student" obtenido de tablas.¹²

En la prueba paralelismo para los intercepto se encontró en todos los casos que los valores de t experimental cae dentro del intervalo $(-t_{tab} < t_{exp} < t_{tab})$, (TABLA 27) por lo que se establece que no hay diferencia significativa entre curvas de calibración elaboradas en dos días diferentes, con un 95 % de confianza, para ambos analistas.

TABLA 27. PRUEBA DE PARALELISMO PARA LOS INTERCEPTOS, ANALISTAS 1 Y 2

ANALISTA 1	
Nitrato de miconazol (195M, 4)	-2.77 < 0.02 < 2.77
Ketoconazol (195M, 3)	-3.18 < 0.08 < 3.18
Itraconazol (195M, 3)	-3.18 < 0.08 < 3.18
ANALISTA 2	
Nitrato de miconazol (195M, 4)	-2.77 < 0.43 < 2.77
Ketoconazol (195M, 3)	-3.18 < 0.17 < 3.18
Itraconazol (195M, 3)	-3.18 < 0.41 < 3.18

t = valor de "t de students" obtenido de tablas.¹²

e) *Diferencia entre analistas.*

Nuevamente se realizó un ANOVA para establecer la diferencia entre analistas, obteniendo en todos los casos que los valores de F experimental es menor a F de tablas ($F_{exp} < F_{teor}$) (TABLA 28) por lo que no existe diferencia significativa entre los dos analistas que prepararon las curvas de calibración, con 95 % de confianza.

TABLA 28. ANALISIS DE VARIANZA PARA ESTABLECER LA DIFERENCIA ENTRE DIAS Y ANALISTAS.

	DIA		ANALISTA	
	$F_{tab(1, 8)}$	F_{exp}	$F_{tab(2, 8)}$	F_{exp}
Nitrato de miconazol	5.32	3.10	4.46	4.20
Ketoconazol	5.32	2.87	4.46	3.39
Itraconazol	5.32	1.52	4.46	2.85

F_{tab} = valor de F obtenido de tablas.¹²

Analizados los puntos anteriores podemos concluir de éste análisis estadístico que las curvas de calibración elaboradas por triplicado, dos días diferentes y trabajando dos analistas presentan linealidad del sistema, y dado que se trata de una técnica colorimétrica, decimos que cumple con la Ley de Lambert-Beer, dentro de un intervalo de concentraciones, siendo para Nitrato de miconazol de 3 - 21 mcg/ml; para Ketoconazol de 3 - 18 mcg/ml y para Itraconazol de 32 - 192 mcg/ml. Es indistito el uso de cualquiera de las dos curvas de calibración elaboradas tanto en días diferentes y como no existe diferencia significativa entre analistas la técnica es reproducible. Finalmente la técnica colorimétrica es adecuada para la determinación analítica cuantitativa de los antimicóticos tipo imidazol utilizados. Potencialmente puede ser adaptada a otros antimicóticos tipo imidazol.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS



1. André, J., Achten, G. Onychomycosis. *International Journal of Dermatology.*, 26 (1987) 481 - 490.
2. Arenas, R. *Dermatología*. Mc Graw-Hill, México, 1989. pp. 379-383.
3. Arenas, R. Las onicomycosis. Aspectos clínico - epidemiológicos, micológicos y terapéuticos. *Gaceta Médica de México.*, 126 (1990) 84 - 91.
4. Arenas, R., Fernández, G., Domínguez, L. Onychomycosis treated with Itraconazole or Griseofulvin alone with and without a topical antimycotic or keratolytic agent. *International Journal of Dermatology.*, 30 (1991) 586 - 589.
5. Arreaza, F., Urrestaraza, I. Estudio de la flora micótica y bacteriana en pacientes con lesiones de las uñas. *Med. Cut. I. L. A.*, 15 (1988) 285 - 290.
6. Beynon, J., Bond, S. *Proteolytic enzymes a practical approach* IRL Press, U. S. A., 1989. pág. 197.
7. Balsam, S., Gershon, D., Rieger, M., Sagarin, E., Strianse, J. *Cosmetics. Science and technology*. Vol. 3. (Second edition), Editorial John Wiley and Sons, U. S. A., 1972. pp. 198 - 202.
8. Cavrini, V., Di Pietra, M., Raggi, A. Colorimetric determination of miconazole nitrate in pharmaceutical preparation. *Pharm. Acta Helv.*, 56 (1981) 183 - 185.
9. Clark's. *Isolation and identification of drugs*. (Second edition), Chapman and Hall, U. K., 1986. pp. 896, 897.

10. Craig, Ch., Stitzel, R. Fisiología Médica, Editorial Interamericana, México, 1985. p 1025.
11. Cortés, J. L. Dermatología clínica (Segunda edición), Clínicas de Alergia S. A., México, 1972. pp. 302 - 303.
12. Daniel, W. Bioestadística (3a. edición), Editorial Limusa, México. 1988.
13. Degreef, H. Onichomycosis. BJCP, Supplement 71 (1990) 91 - 97.
14. Dixon, M., Webb, E. Enzymes (Third edition), Academic Press, U. S. A., 1977. pp. 306, 341, 322, 350, 375.
15. Domonks, A., Odom, R. Tratado de dermatología (Tercera edición), Salvat Editores, España, 1985. pp. 398 - 402.
16. Fitzpatrick, T., Eise, A., Wolff, K., Freedberg, I., Austen F. Dermatology in general medicine. VOL. 2. (Third edition), Mc Graw-Hill, U. S. A., 1987. pp. 2223 - 2229.
17. Flynn, G., Smith, E. Membrane diffusion I: Desing and testing of a new multifeatured diffusion cell. J. Pharmaceutical Sciences., 60 (1971) 1713-1717.
18. Franz, T. Percutaneous absorption. On the relevance of in vitro data. J. Invest. Dermatology., 64 (1975) 190-195
19. Friend, D. In vitro skin permeation techniques. Journal of Controlled Release., 18 (1992) 235 - 248.
20. García-Valdecasas, F. Farmacología (Séptima edición), Librería ESPAXS, España, 1978. Pág. 557

21. Gummer, L., Hinz, S., Maibach, H. The skin penetration cell: a desing update. International Journal Pharmaceutics., 40 (1987) 101-104.

22. Ham, A. Tratado de Histología (Sexta edición), Editorial Interamericana, México, 1970. pp. 844 - 848.

23. Hay, R., Clayton, M., Moore, K., Midgely G. An evaluation of Itraconazole in the management of onychomycosis. British Journal of Dermatology., (1988) 359 - 366.

24. Heycants, J., Van Peer, A., Van de Velde, V., Van Rody, P., Meulder, W., Lavrijsen, K., Woestenborghs, R., Van Cutsem, J., Cauwenbergh, G. The clinical pharmacokinetics of Itraconazole an overview. Mycoses. 32 (Suppl. 1) (1989) 67 - 87.

25. The Index Merck (Tenth edition), Merck and Co., Inc., U. S. A., 1983.

26. Jacobs, S. Anatomía y Fisiología humana. (Cuarta edición), Nueva Editorial Interamericana, México, 1982. pág. 82.

27. Kreyszing, E., Estadística matemática, Limusa, México, 1981.

28. Litter, M. Farmacología. Experimental y clínica (Séptima edición), Editorial El Ateneo, Argentina, 1986. pp. 1326, 1414 - 1417, 1428 - 1434, 1444 - 1453, 1630 - 1639.

29. Macura, A. B. Fungal resistance to antimycotic drugs. International Journal of Dermatology., 30 (1991) 181 - 183.

30. Magaña, M. Introducción a la dermatología. Clínicas de Alergia S. A, México, 1984.

31. Martin, A., Swarbrick, J., Cammarat, A. *Physical pharmacy* (Third edition), Lea and Febiger, U. S. A., 1983. pp. 394 - 404.
32. Mcallister, R. *Las enzimas y determinación de la actividad enzimática*, Editorial El Manual Moderno, México, 1975. pp. 85, 86.
33. Mensing, H., Spalenmann, V. *Evaluation of the antimycotic activity of the pathological substance under the nail after treatment with RO 14-4787 nail lacquer*. *Dermatology in Europe*. 1st. Congress of the European Academy of Dermatology and Venereology. Florence, Italy. 1989.
34. Onsberg, P., Dorrit, S., Veien, N. *Onychomycosis caused by ASPERGILLUS TERREUS*. *Sabouroudia.*, 16 (1978) 39 - 46.
35. Pearce, E. *Manual de anatomia y fisiologia* (Segunda edición), Editorial Alicien, España, 1981. pp. 313, 314
36. Polak, A., Zaag, M. *Amorolfine*. In: *Handbook of experimental pharmacology* (Vol. 96). Ed. Ryley, Springer - Verlag. Berlin Heidelberg, 1990. pp. 505 - 521.
37. Prose, N., Abson, K., Scher, R. *Disorders of the nails and hair associated with human immunodeficiency*. *International Journal of Dermatology.*, 31 (1992) 453 - 457.
38. Quiroga, M., Gullot, C. *Cosmética y dermatología práctica* (Quinta edición), Editorial El Ateneo, Argentina, 1986. pp. 128 - 133.
39. Robinson, J., Vincent, L. *Controlled drug delivery* (V. 29), Marcel Dekker, INC., U. S. A., 1987. pp. 98 - 136.
40. Rodríguez, Y. *Solo hay en México doce investigadores en*

micologías UNAM. El Universal (Sección de Estados). Jueves 12 de noviembre de 1992, México D. F. Pág. 5.

41. Shelley, W. Dermatología, Editorial Interamericana, México, 1973. pp. 28 - 32.

42. Thorpe, V. Bioquímica, C. E. C. S. A., México, 1967. pp. 111, 243.

43. Torres-Rodríguez, J. Micosis que afectan piel y mucosas. Ediciones DOYMA, España, 1987. pp. 137-148, 153-163.

44. U. S. PHARMACOPEIA CONVENTION, Inc. The United States Pharmacopeia. 22th ed. National Formulary XVII ed., Rockville, U. S. A. 1990.

45. Walkers, K., Flynn, G., Marvel, J. Physicochemical characterization of the human nail: permeation pattern for water and the homologous alcohol and differences with respect to the stratum corneum. Journal Pharm. Pharmacol., 35 (1983) 28 - 33.

46. Walsh, E. Introducción a la bioquímica, Edit. Acribia, España, 1971. pp. 74, 82.

47. West, S., Todd, W., Howard, M., Van Bruggen, J. Bioquímica médica (Cuarta edición), Editorial Interamericana, México, 1969. pp. 1023 - 1025.

48. Wilkinson, J., Moore, J. Harry's cosmetology (Seventh edition), Chemical Publishing, U. S. A., 1982. pp. 363 - 367.

49. Windle, W. Histología (Quinta edición), Mc Graw-Hill Latinoamericana, México, 1977. p 397.