



UNIVERSIDAD PERUANA
CAYETANO HEREDIA

“FORMULACIÓN DE TIOCONAZOL
UNGÜENTO OFTÁLMICO Y SU
EFICACIA PRECLÍNICA PARA EL
TRATAMIENTO DE LA QUERATITIS
FÚNGICA”

TESIS PARA OPTAR EL GRADO
DE MAESTRO EN
TECNOLOGÍA FARMACÉUTICA

ROBERTO MICHAEL ORIHUELA
ECHAVIGURIN

LIMA – PERÚ

2024

ASESOR

MSc. Leon Faustino Villegas Vilchez

JURADO DE TESIS

DR. MÓNICA JEHNNY PAJUELO TRAVEZAÑO

PRESIDENTE

MG. CARLOS ENRIQUE CABRERA GARCIA

VOCAL

MG. ELSA CAROLINA PONCE DE LEÓN DE LAMA

SECRETARIA

DEDICATORIA.

A mi amada esposa Lízze quien fue la primera persona en motivarme y apoyarme
en la realización de la presente investigación.

A mis adorados hijos: Adriel y André, quienes son el motivo de mi vida.

AGRADECIMIENTOS.

A mis padres y hermanos quienes siempre son fuente de motivación y apoyo en toda actividad que uno realiza.

Al Dr. Luis Mesías Costilla, Dra. Marleni Mendoza Cabanillas quien nos proporcionó importante fuente de información y metodología oftálmica.

Al Sr. Javier Gamboa Burgos, gerente general de Laboratorios Lansier, por darme la confianza y el apoyo constante para el desarrollo de la investigación.

Al Equipo Técnico de Laboratorios Lansier, quienes siempre están dispuestos a contribuir con las investigaciones que realizamos.

A mi amigo y colega el Dr. Christian Palomino Flores por su asesoría metodológica.

Al Servicio de Control de Calidad de UPCH, por su apoyo en los ensayos técnicos científicos.

FUENTES DE FINANCIAMIENTO.

Laboratorios Lansier S.A.C.

Concytec – Beneficios Tributarios

DECLARACION DE CONFLICTO DE INTEREZ.

El autor declara que no tienen conocidos competidores, intereses o relaciones personales que podrían haber podido influir en los resultados reportados en este trabajo.

FORMULACIÓN DE TIOCONAZOL UNGÜENTO OFTÁLMICO Y SU EFICACIA PRECLÍNICA PARA EL TRATAMIENTO DE LA QUERATITIS FÚNGICA

INFORME DE ORIGINALIDAD

18%	18%	2%	5%
INDICE DE SIMILITUD	FUENTES DE INTERNET	PUBLICACIONES	TRABAJOS DEL ESTUDIANTE

FUENTES PRIMARIAS

1	dspace.unitru.edu.pe Fuente de Internet	3%
2	hdl.handle.net Fuente de Internet	2%
3	idus.us.es Fuente de Internet	2%
4	idoc.pub Fuente de Internet	2%
5	Submitted to Universidad Nacional de Trujillo Trabajo del estudiante	1%
6	1library.co Fuente de Internet	1%
7	asac.net Fuente de Internet	<1%
8	docplayer.es Fuente de Internet	<1%

TABLA DE CONTENIDOS

RESUMEN

ABSTRACT

I. INTRODUCCION	1
II. OBJETIVOS	3
II.1. Objetivo general	3
II.2. Objetivos Específicos	3
III. HIPOTESIS	4
IV. MARCO TEORICO	5
V. METODOLOGIA	13
V.1. Diseño del estudio	13
V.2. Muestra:	13
V.3. Criterios de selección	15
V.4. Variables	15
V.5. Técnicas y procedimientos	20
V.6. Plan de Análisis	41
V.7. Consideraciones éticas	41
VI. RESULTADOS	43
VII. DISCUSIONES	63
VIII. CONCLUSIONES	67
IX. RECOMENDACIONES	68
X. BIBLIOGRAFIA	69
XI. ANEXOS	

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Cromatograma del estándar de tioconazol	52
Figura 2: Cromatograma de la muestra de tioconazol	52
Figura 3: Halos producidos por la inhibición del tioconazol.	54
Figura 4: Aplicación de tioconazol ungüento oftálmico en las celdas de Franz... 56	
Figura 5: Curva de permeabilidad tioconazol en cornea de cerdo utilizando las celdas de Franz, concentraciones VS tiempo.....	56
Figura 6: Ojo inducido a queratitis fúngica con <i>Candida albicans</i>	58
Figura 7: Área de infiltración desde día cero al siete.....	59

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Distribución de muestra en sub grupos	14
Tabla 2: Atributos de calidad asociados al perfil del producto	20
Tabla 3: Evaluación de los atributos críticos de calidad y su impacto en la formula:	21
Tabla 4: Pruebas de prefomulación para llegar al porcentaje de proporciones.....	22
Tabla 5: Formula tioconazol 6,5% ungüento oftálmico.....	22
Tabla 6: Formula de tioconazol 3 % ungüento oftálmico.....	23
Tabla 7: Formula de tioconazol 1 % ungüento oftálmico.....	23
Tabla 8: tabla de diseños factoriales de Youden-Steiner	30
Tabla 9: Cuadro de Evaluación	36
Tabla 10: Resultados de las fórmulas desarrolladas de tioconazol 1%, 3% y 6,5% ungüento oftálmico.....	43
Tabla 11: Estudio de estabilidad acelerada de tioconazol 1% ungüento oftálmico.	53
Tabla 12: Estudio de estabilidad acelerada de tioconazol 3% ungüento oftálmico.	53
Tabla 13: Estudio de estabilidad acelerada de tioconazol 6,5% ungüento oftálmico.	53
Tabla 14: Medidas de halos en milímetros de las concentraciones de tioconazol ungüento oftálmico.....	55
Tabla 15: Score de irritación aguda ocular.	55
Tabla 16: Datos obtenidos de los ensayos de permeabilidad en las celdas de Franz	57

Tabla 17: Opacidad corneal	57
Tabla 18: Nivel de hipopion.....	57
Tabla 19: Área de lesión o infiltración ocular y el tratamiento con tioconazol. ...	58
Tabla 20: Porcentaje de reducción de la lesión de las fórmulas:	59
Tabla 21: Porcentaje de aumento de la lesión del placebo:	59
Tabla 22: Histología de ojos con tratamiento Muestra 1 %.....	60
Tabla 23: Histología de ojos con tratamiento Muestra 3 %.....	60
Tabla 24: Histología de ojos con tratamiento Muestra 6,5 %.....	61
Tabla 25: Histología de ojos con tratamiento placebo.	62

RESUMEN

La tecnología farmacéutica nos permite entre otras cosas, formular medicamentos en diferentes formas farmacéuticas para conseguir aliviar o tratar alguna enfermedad específica. Existe una enfermedad llamada queratitis fúngica que es una infección de la córnea que causa dolor, disminución de la visión, sensibilidad a la luz, lagrimeo y/o secreción del ojo. Es consecuencia de la infección fúngica proveniente del uso de lentes de contacto, de una lesión o trauma ocular, por lo general se desarrolla muy rápidamente, y si no es tratada a tiempo, podría causar ceguera irreversible. El petitorio de productos farmacéuticos nacional de oftalmología del ministerio de salud del Perú, emitido en abril del 2022, dispone de una sola molécula antimicótica oftálmica que es la natamicina al 5%, la cual es de alto costo, sobre todo para los pacientes de escasos recursos económicos quienes son los que más la padecen. Con el objetivo de incrementar la accesibilidad de medicamentos y brindar nuevas opciones al tratamiento de la queratitis fúngica se desarrolló el presente estudio que busca lograr la formulación del tioconazol ungüento oftálmico a diferentes concentraciones y evaluar su eficacia preclínica en el tratamiento de la queratitis fúngica causada por hongos del género *Cándida albicans*. Haciendo uso de la tecnología farmacéutica que involucra el proceso de manufactura y los controles de calidad respectivo, se logró desarrollar dichos ungüentos oftálmicos. Estas formulaciones fueron sometidas a pruebas de calidad, estudios de estabilidad en condiciones aceleradas, análisis para verificar que durante el proceso de manufactura no haya perdido su actividad antifúngica *in vitro*, se determinó su nivel de permeabilidad en la córnea de cerdo por el método de las

celdas de Franz, se evaluó si causaba irritabilidad ocular y finalmente se evaluó su eficacia en el tratamiento de la queratitis fúngica en modelo animal.

Se indujo a queratitis en la córnea de los conejos, con un inóculo estandarizado de *Candida albicans*, veinticuatro horas después fueron tratados con tioconazol ungüento oftálmico de 1%, 3% y 6,5%, cuatro veces por día (8:00 am, 12:00 am, 4:00 pm 8:00 pm) durante 7 días en el ojo afectado en la cual se evidencio que hubo una recuperación eficaz con respecto al control o placebo. La concentración de 3% y 6,5% no tienen diferencias estadísticamente significativas ($P>0,05$), así mismo, se evidencio que no produce alguna irritación ocular los ojos del conejo. Las fórmulas desarrolladas de esta nueva forma farmacéutica de Tioconazol ungüento oftálmico, es eficaz y segura preclínicamente para el tratamiento de la queratitis fúngica causada por *Candida albicans*. la cual podría continuar con estudios clínicos en humanos brindado una alternativa más para los pacientes que lo padecen.

PALABRAS CLAVES

Tioconazol, ungüento oftálmico, queratitis fúngica, modelo en conejos, *Candida albicans*.

ABSTRACT

Pharmaceutical technology allows us, among other things, to formulate medications in different pharmaceutical forms to alleviate or treat a specific disease. There is a disease called fungal keratitis, which is an infection of the cornea that causes pain, decreased vision, sensitivity to light, watering and/or discharge from the eye. It is a consequence of fungal infection from the use of contact lenses, an eye injury or trauma, it usually develops very quickly, and if not treated in time, it could cause irreversible blindness. In the request for national ophthalmology pharmaceutical products of the Ministry of Health of Peru, issued in April 2022, Peru has only one ophthalmic antifungal molecule, which is 5% natamycin, which is high cost, especially for Less well-off patients with limited economic resources are the ones who suffer the most. With the aim of increasing the accessibility of medications and providing new options for the treatment of fungal keratitis, this study was developed to achieve the optimal formulation of tioconazole ophthalmic ointment at different concentrations and evaluate its preclinical efficacy in the treatment of keratitis. fungal disease caused by fungi of the genus *Candida albicans*. Using pharmaceutical technology that involves the manufacturing process and the respective quality controls, it was possible to develop these ophthalmic ointments. These formulations were subjected to quality tests, stability studies under accelerated conditions, analysis to verify that during the manufacturing process it has not lost its antifungal activity in vitro, its level of permeability in the pig cornea was determined by the method of Franz cells, it was evaluated if it caused ocular irritability and finally its effectiveness in the treatment of fungal keratitis was evaluated in an animal model of rabbits.

Said keratitis was induced in the cornea of rabbits, with a standardized inoculum of *Candida albicans*, twenty-four hours later they were treated with tioconazole ophthalmic ointment of 1%, 3% and 6,5%, four times a day (8:00 am, 12 :00 am, 4:00 pm 8:00 pm) for 7 days in the affected eye in which it was evident that there was an effective recovery compared to the control or placebo. The concentration of 3% and 6,5% do not have statistically significant differences ($P>0,05$), likewise, it was evident that it does not cause any ocular irritation to the rabbit's eyes. The formulas developed for this new pharmaceutical form of Tioconazole ophthalmic ointment are preclinically effective and safe for the treatment of fungal keratitis caused by *Candida albicans*, which could continue with clinical studies in humans, providing another alternative for patients who suffer from it.

KEY WORDS

Tioconazole, ointment ophthalmic, fungal keratitis, rabbit model, *Candida albicans*.

I. INTRODUCCION

En la actualidad, es muy importante que la población mundial tenga acceso a diferentes alternativas de medicamentos para tratar sus múltiples enfermedades, no obstante, existen algunas restricciones a dichos medicamentos por costos, protección de patentes, muy poco o únicos fabricantes que disminuye la accesibilidad de medicamentos a los pacientes. La tecnología farmacéutica juega un papel muy crucial en el desarrollo de nuevas alternativas farmacéuticas, mejora de productos, opciones innovadoras que tengan costos cada vez más eficientes y ofrezcan a la población mayor accesibilidad a los medicamentos.

La queratitis fúngica, es una enfermedad que si no se trata adecuadamente y con la debida celeridad, puede llegar a producir una ceguera irreversible (1) en los pacientes que lo padecen, actualmente en el Perú, solo existe un fármaco para el tratamiento de esta enfermedad, se trata de la natamicina al 5% en suspensión oftálmica (2) cuyo precio por frasco es bastante elevado con respecto al precio promedio de los medicamentos oftálmicos y este alto costo limitan el acceso de pacientes con bajos recursos económicos. Los reportes de casos son muy bajos, por tal razón no es un negocio para los diversos fabricantes o laboratorios, no le prestan mucha atención, similar a lo que ocurre con las enfermedades huérfanas (3).

Existen muchas moléculas antimicóticas cuyo uso es por vía oral, intravenosa y tópica, entre ellos tenemos al tioconazol al 6,5% pomada vaginal, que se usa para la candidiasis vulvovaginal, enfermedad que se estima que dos tercios de las mujeres adultas sufrirán un episodio durante su vida (4) . Así mismo, en una publicación en la revista escrita peruana Monitor Medico de julio del 2021, llamada:

“ulceras micóticas: tratamiento con Tioconazol” (5) indica que esta molécula en forma de pomada vaginal sería eficaz para el tratamiento de la queratitis fúngica. Con el objetivo de incrementar la accesibilidad de medicamentos para tratar la queratitis fúngica, nos surge la interrogante central de la presente investigación: ¿el desarrollo de una formulación del tioconazol en la forma farmacéutica de ungüento oftálmico sería eficaz preclínicamente para el tratamiento de la queratitis fúngica causada por el género *Candida albicans*? La presente investigación tiene por objetivo principal formular el tioconazol ungüento oftálmico a diferentes concentraciones, evaluar su eficacia preclínica en el tratamiento de la queratitis fúngica causada por hongos del género *Candida albicans* en modelos animales. Esto permita dar mayor accesibilidad y disponibilidad de medicamentos a la población que padece dicha enfermedad y sirve de base para posteriores estudios clínicos en humanos.

II. OBJETIVOS

II.1. Objetivo general

Formular el tioconazol ungüento oftálmico a diferentes concentraciones, y evaluar su eficacia preclínica en el tratamiento de la queratitis fúngica causada por hongos del género *Candida albicans*.

II.2. Objetivos específicos

1. Formular tioconazol ungüento oftálmico al 1%, 3% y 6,5%.
2. Evaluar la calidad y ejecutar los estudios de estabilidad en condiciones aceleradas.
3. Evaluar la actividad antifúngica del tioconazol ungüento oftálmico al 1%, 3% y 6,5%.
4. Determinar la irritabilidad ocular *in vivo* en conejos del tioconazol ungüento oftálmico al 1%, 3% y 6,5%.
5. Demostrar la eficacia preclínica contra la queratitis fúngica del tioconazol ungüento oftálmico *in vitro* e *in vivo*.

III. HIPOTESIS

El tioconazol ungüento oftálmico será eficaz preclínicamente para el tratamiento de la queratitis fúngica causada por el género *Candida albicans*.

IV. MARCO TEORICO

IV.1. Formulación de Medicamentos:

La formulación de medicamentos es una actividad técnica científica que nos permite diseñar formas farmacéuticas para prevenir, aliviar o curar las diferentes enfermedades que aquejan a la población mundial (6). Para las formulaciones oftálmicas a pesar de que son de uso tópico externo, la farmacopea de los Estados Unidos de América entre otros atributos de calidad, exige que sean estériles dado que los ojos son órganos muy sensibles. Los procesos de manufactura deben contemplar ambientes adecuados (clean room) y calificados bajo las normativas sanitarias de la OMS o ICH para envasados en condiciones estériles (7). La forma de esterilizar los formulados oftálmicos poder ser por métodos de filtración, esterilización por calor húmedo, óxido de etileno o procesado en sistemas de envasado aséptico.

Las formulaciones oftálmicas deben cumplir con una amplia gama de pautas, tanto fisiológicas como reguladoras. La oftalmología sigue siendo una de las categorías de productos farmacéuticos con más éxito en todo el mundo, muchos medicamentos oftálmicos convencionales son relativamente fáciles de desarrollar y fabricar; un hecho que atrae a un número cada vez mayor de desarrolladores farmacéuticos a este, en algunos países del mundo, muchas lágrimas oftálmicas incluso van cambiando de categoría, pasan de ser medicamentos a dispositivos médicos por su nivel de riesgo (8). Pero el mundo de la oftalmología no está exento de desafíos. Las formulaciones oftálmicas deben equilibrarse cuidadosamente para garantizar una biodisponibilidad adecuada y una irritación

mínima, al tiempo que se mantiene un control de calidad suficiente para obtener la aprobación sanitaria (13).

Consideraciones claves en el desarrollo de la formulación oftálmica:

Una formulación oftálmica puede tomar la forma de una solución, una suspensión, un ungüento, emulsión o nanoemulsión. Una de las formas más populares de formulación oftálmica es la solución tópica: una solución que permite que el ingrediente farmacéutico activo se instile directamente sobre la superficie del ojo(9). Las instilaciones oftálmicas son fáciles y seguras, no obstante tienden a ofrecer una baja biodisponibilidad, ya que el parpadeo y el drenaje nasolagrímico tienden a eliminar la mayor parte de la solución oftálmica del saco conjuntival (10). Para superar esta barrera, se han ido desarrollando una serie de formulaciones alternativas innovadoras. Por ejemplo, las Nanoemulsiones que logran aumentar la biodisponibilidad de los medicamentos en incluso necesitan variar su dosis al tener mayor penetración del principio activo (11). Al variar el tamaño de las partículas de fármaco dentro de una suspensión, el fabricante puede incluso crear una formulación en la que algunas partículas se absorben de inmediato, mientras que otras se detienen en la bolsa precorneal para su liberación a más largo plazo (12).

Se debe considerar también la dispersión de los principios activos en bases oleosas como el petrolato y aceite mineral que se derrite a la temperatura del parpado del ojo, creando un ungüento que se puede aplicar directamente a la córnea. A medida que el ungüento se derrite con la temperatura ocular, el principio activo se va liberando a un ritmo sostenido durante un período prolongado (13). Estos

ungüentos son recomendados para tratamientos crónicos donde se necesitan contacto directo y constante del fármaco con la superficie corneal. Para una combinación de alta biodisponibilidad y excelente solubilidad, se viene recurriendo a emulsiones, en las cuales el principio activo se disuelve en aceite, que luego se dispersa en agua. Las emulsiones pueden proporcionar altas concentraciones de principio activo durante períodos prolongados, con irritación mínima (14). Estas emulsiones actualmente están siendo transformadas en nanopartículas que aumentaría la biodisponibilidad de la molécula (15). Las diversas compañías del mundo están probando una amplia gama de aditivos de emulsión, desde polímeros mucoadhesivos a aditivos lipídicos para mejorar el desempeño de los medicamentos oftálmicos (13).

El pH de la formulación oftálmica debe ser similar al del líquido lagrimal:

Un desafío único del desarrollo de la formulación oftálmica es el del pH. Si bien todas las formulaciones de medicamentos deben tener un pH equilibrado de manera que optimicen la estabilidad y la biodisponibilidad de su principio activo las formulaciones oftálmicas también deben evitar causar irritación a la córnea altamente sensible y al tejido precorneal. Con el fin de evitar la irritación, el pH de las formulaciones oftálmicas se debe mantener lo más cerca posible a 7,4, el pH del líquido lagrimal. Por supuesto, esto presenta algunos desafíos de desarrollo, ya que muchos medicamentos son químicamente inestables a este pH. Por esta razón, muchos fabricantes oftálmicos agregan tampones de pH a sus formulaciones, con el fin de ajustar con delicadeza el pH en un rango que preserva el principio activo, al mismo tiempo que causan un mínimo de irritación ocular (13).

IV.2. Formulación de ungüentos oftálmicos:

Es una forma farmacéutica semisólida que se desarrolla en bases oleosas destinados a ser aplicado en la conjuntiva y cornea la cual genere liberación sostenida del fármaco, deben tener propiedades no irritantes, con una fluidez adecuada para facilitar la aplicación (14). Los ungüentos oftálmicos que son matrices oleosas en base de aceite mineral y petrolato, no siempre logran solubilizar los principios activos, por tal motivo se considera como una dispersión farmacéutica. Esta dispersión es una estrategia que nos permite lograr la permeabilidad y por efecto conseguir la mayor biodisponibilidad posible del fármaco (16).

En la industria farmacéutica, los ungüentos son fabricados por fusión de aceite y fases acuosas en dos partes separadas. Tanques reactores con agitadores para una correcta homogenización, las dos fases de ungüento se transfieren al recipiente principal a través de válvulas y tuberías. Los tanques proporcionan agitación durante todo el proceso de operación, la mezcla debe ser uniforme de todos los componentes de la fórmula, es importante para evitar formación de aglomerados y distribución no uniforme (17). El contenido no se mezcla uniformemente en los puntos muertos del recipiente, por lo tanto, si fuera necesario se requieren pasos adicionales para la recirculación o sistemas de agitación planetario que consiste en paletas que abarcan todo el diámetro del tanque para evitar el desperdicio de producto acumulado en los puntos muertos (15).

Excipientes utilizados en ungüentos oftálmicos (13):

Vaselina: es uno de los componentes principales de un ungüento oftálmico, llamada también: vaselina, vaselina blanca, parafina blanda y cera de parafina.

Petrolato: es un hidrocarburo derivado del petróleo, cuenta con ventajas convenientes para las formulaciones oftálmicas las cuales son:

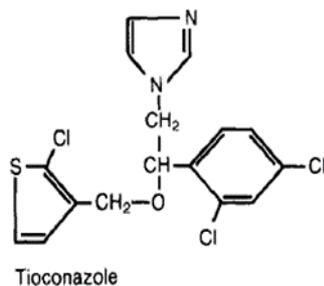
- 1) Punto de fusión cercana a la temperatura corporal.
- 2) No irrita los ojos.
- 3) Comportamiento reológico adecuado para la superficie ocular.
- 4) Maniobrable viscosidad ajustando con una proporción de aceite mineral.
- 5) Bajo costo.

Estas formulaciones son capaces de prolongar la tiempo de contacto en la superficie ocular en comparación con soluciones oftálmicas (13).

IV.3. Tioconazol:

El nombre químico del Tioconazol es: 1-[2-[(2-cloro-3-tienil)metoxil]-2-(2,4-diclorofenil)etil]-1H. Pertenece al grupo de imidazol, Desde el enfoque “*in vitro*”, posee un amplio espectro de actividad frente a dermatofitos (*Trichophyton sp*, *Microsporum sp*, *Epidermophyton floccosum*), levaduras (*Candida albicans* y *sp*) hongos levuliformes y *Pityrosporum orbiculare*, presentando asimismo actividad frente a algunos gérmenes Grampositivos (4).

Estructura química del tioconazol (11):



Propiedades farmacocinéticas: El tioconazol no produce niveles plasmáticos significativos después de su aplicación tópica. Los niveles plasmáticos encontrados son despreciables.

Datos preclínicos sobre seguridad: Los estudios clínicos controlados han demostrado una óptima tolerancia clínica y biológica y ningún efecto colateral de relieve en la administración aguda y crónica también a dosis muy superiores de las consideradas terapéuticas. (11)

IV.4. Queratitis Infecciosa:

La queratitis infecciosa es una enfermedad causa importante de pérdida visual a nivel mundial, sobre todo en países en vías de desarrollo, pudiendo ser el resultado de un traumatismo ocular menor, combinado con una mala higiene (18).

Las causas más comunes son (19):

- Infecciones bacterianas: Causada mayormente por dos bacterias que son *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*.
- Infecciones víricas: causado por el virus herpes simple puede provocar úlceras recurrentes en momentos de estrés, sistema inmunitario deficiente o exposición solar.
- Infecciones micóticas (por hongos): Por traumas o lesiones oculares, frecuentes en pacientes inmunodeprimidas, mal uso de lentes de contacto o uso de corticoides.
- Infecciones parasitarias (*Acanthamoeba*): Causado por amebas unicelulares microscópicas que pueden provocar infecciones.

IV.5. Queratitis Fúngica o Micótica:

La queratitis fúngica en el mundo es una de las principales causas de ceguera afectando a entre 6 y 8 millones de personas en todo el mundo (OMS, 2019a, 2019b). De todos los casos se estima que entre el 8% y el 11% de los pacientes tuvieron que extirparse el ojo (20). Una de las causas más comunes es el traumatismo con materia vegetativa contaminada y lentes de contacto. Las especies que generalmente causan la infección son *Aspergillus*, *Candida* y *Fusarium* (15).

Es más frecuente en los continentes de Asia y África, en climas tropicales y subtropicales, siendo los más afectados varones adultos que laboran en sembríos con bajo poder adquisitivo, por lo cual es muy importante su tratamiento oportuno y efectivo (20).

La sintomatología clínica de la queratitis micótica habitualmente es subaguda, presencia de dolor ocular, lagrimeo, fotofobia, eritema, secreción y visión borrosa. Los signos clínicos evidencian ulceración y opacidad corneal, que podría evolucionar a una uveítis micótica y, en algunas ocasiones a una endoftalmitis (21).

Para el diagnóstico de queratitis micótica, se utilizan las siguientes técnicas (22):

1. Imagen in vivo, microscopía confocal y tomografía de coherencia óptica del segmento anterior.
2. Investigaciones microbiológicas, examen microscópico directo y el cultivo de raspados de córnea.
3. PCR complementada con los métodos microbiológicos; lo que permite una identificación rápida y específica del agente etiológico.

Tratamiento de la Queratitis fúngica:

La primera elección de los oftalmólogos para el tratamiento de la queratitis fúngica es la natamicina 5 % suspensión oftálmica, fue la primera molécula aprobada por la FDA para el tratamiento de la queratitis fúngica (Alcon Laboratories Inc., 2008) (15).

El mecanismo de acción de la natamicina es bloqueando la síntesis de ergosterol en la pared celular de los hongos sin interactuar con las membranas celulares humanas. Pertenece al grupo de los polienos y tiene amplia gama de aplicaciones como son: infecciones de la piel, micosis oftálmicas, candidiasis oral, candidiasis vaginal, infecciones broncopulmonares y diversas infecciones fúngicas sistémicas (23).

El tratamiento podría incluir diversos fármacos oftálmicos antimicóticos administrados por vía tópica, sistémica, inyecciones intracamerales o intracorneales (24). Existen otros fármacos que se puede emplear como los azoles/imidazoles (ketoconazol, miconazol, econazol) o triazoles (itraconazol, voriconazol) (25).

Uno de los tratamiento quirúrgicos de la queratitis fúngica se basa en la queratoplastia tectónica penetrante y lensectomía las cuales dieron resultados eficaces para un caso donde se sospecha una etiología fúngica en un absceso corneal progresivo e intratable con los fármacos: anfotericina B, caspofungina, voriconazol, vancomicina y ceftazidima (26). Es preciso señalar que cuando falla el tratamiento medicamentoso, recién de aplica la cirugía terapéutica.(22).

V. METODOLOGIA

V.1. Diseño del estudio

El Diseño de estudio fue experimental porque hay manipulación de variables, la variable independiente sobre la variable dependiente. Se ensayaron 3 concentraciones del principio activo: 1%, 3% y 6,5%, las cuales corresponde a 3 grupos de 7 conejos. Se tiene un cuarto grupo, que fue de control, las cuales, también se les inoculo *Candida albicans*, pero, en lugar de aplicar la fórmula, se aplicó un placebo, para verificar que los excipientes o sistema inmunológico del conejo no interfiera en el estudio. El placebo, es el mismo producto que tiene todos los insumos, pero sin el principio activo, y también paso por el mismo proceso de fabricación y esterilización.

V.2. Muestra:

Para el cálculo de tamaño de muestra se consideró la diferencia de dos medias independientes, se realizó con el calculador en línea [select statical services](#) (27).

Calculator

What confidence level do you need? % 
Typical choices are 90%, 95%, or 99%

What power do you need? % 
A common choice is 80%

What is the hypothesised difference? 

What is the population variance? 

Your recommended sample size is 

Donde:

Diferencia hipotética: 42 (28)

Varianza poblacional: 643 (28)

El tamaño de muestra recomendado por grupo fue de $n=6$, sin embargo, se trabajó con 7 conejos por grupo, por la complejidad del método y de esa forma fue aprobado por el comité de ética de animales de la UPCH.

Tabla 1: Distribución de muestra en sub grupos

Concentración:	Tioconazol 1%	Tioconazol 3%	Tioconazol 6,5%	Control Placebo
No de Conejos	7	7	7	7

Fuente: Elaboración propia.

Por cada conejo, el ensayo se realizó en un solo ojo (izquierdo) y el ojo derecho se tomó como control negativo de la inoculación de los hongos, es decir, para verificar que la inoculación haya producido la queratitis fúngica ocular en dicho ojo.

Para el ensayo de toxicidad o irritabilidad ocular, se utilizaron 4 conejos con los mismos criterios de selección.

V.3. Criterios de selección

Se utilizó conejos albinos de Nueva Zelanda (*Oryctolagus cuniculus*) que no presentaron infección alguna en los ojos (29). cuyo peso corporal estaba entre 2000 g a 3000 g, con una edad estimada entre cuatro a seis meses (30). Además, los conejos no fueron utilizados en otros estudios y no presentaron algún síntoma de enfermedad o deficiencia.

Los conejos fueron adquiridos en el bioterio del instituto nacional de salud del ministerio de salud del Perú; Así mismo no fue necesario un periodo de cuarentena, ni acondicionamiento debido a que son ensayos externos o a nivel tópico.

Los animales fueron ubicados en ambiente de experimentación para animales del servicio de control de calidad-LID de FCF-UPCH bajo condiciones de temperatura (22-25°C) y porcentaje de humedad (menor a 75% HR) ambiental. La luz artificial y natural sin una exigencia especial.

V.4. Variables

Operacionalización de variables para el ensayo de eficacia *In Vivo*:

Ver la siguiente tabla:

Variables	Definición operacional	Indicador	Criterios de medición	Escala de medición	Instrumento
Irritabilidad ocular	Reacción o evento adverso ocurrido en el animal después del inicio de la terapia	Daños, lesiones, síntomas, reacciones sobre la córnea, conjuntiva e iris durante el periodo de observación.	0.Iritación 1. No irritación.	Nominal	Reporte de Ensayo
Opacidad corneal	Nivel de lesión corneal generada por el ensayo.	Parámetro registrado en los reportes del ensayo	0: Cornea clara. 1: Edema menor. 2: Edema corneal en 2 cuadrantes de la córnea.	Nominal	Reporte de Ensayo

			3: Edema corneal en más de 3 cuadrantes de la córnea. 4: Opacidad total de la córnea.		
Nivel de hipopion	Característica del Hipopion generado por la lesión corneal.	Parámetro registrado en los reportes del ensayo	0. Ninguno 1. Leve + 2. Moderado ++ 3. Severo +++ (con escala en cruces: de 0 a 3+)	Nominal	Reporte de Ensayo
Área de infiltración ocular	Área de lesión corneal generada según el método del ensayo.	Parámetro registrado en los reportes del ensayo	Milímetros	Razón	Reporte de Ensayo

Permeabilidad ocular	Porcentaje de fármaco permeado en cornea animal	Parámetro registrado en los formatos del ensayo	Porcentaje de Permeado (%P)	Razón	Reporte de Ensayo
Evaluación histológica	Característica de los Epitelios Corneales posterior al tratamiento.	Parámetro registrado en los formatos del ensayo	0. Epitelio corneal sin alteraciones. 1. Zonas con edema, incremento de capilares sanguíneos y células inflamatorias.	Nominal	Reporte de Ensayo

V.5. Técnicas y procedimientos

1. Desarrollo del ungüento oftálmico:

Se desarrolló una fórmula básica y estándar para ungüentos oftálmicos que generalmente contiene bases oleosas que favorecen la adherencia a la superficie ocular y la liberación progresiva del principio activo.

2. Perfil del Producto a formular:

Principio Activo: tioconazol (1%, 3 % y 6,5%)

Conservador: metilparabeno y propilparabeno.

Forma Farmacéutica: ungüento oftálmico.

Aspecto: Preparación de consistencia blanda, blanquecina, homogénea.

Material de Envase: Tubo ABL con tapa rosca y dosificador oftálmico.

Esterilidad: Ungüento oftálmico estéril.

Tabla 2: Atributos de calidad asociados al perfil del producto

ATRIBUTOS DE CALIDAD	OBJETIVOS DE CALIDAD		CRITICIDAD
	PERFIL DEL PRODUCTO OBJETIVO	OBJETIVO DE CALIDAD CUANTITATIVO	
Aspecto	Preparación de consistencia blanda, blanquecina, homogénea.	Preparación de consistencia blanda blanquecina, homogénea. suave al tacto	MEDIA
Identidad	La identificación de la Muestra corresponde al Estándar de Referencia	El tiempo de retención de la muestra corresponde al Estándar de Referencia	ALTA
Potencia	90 – 110%	100%	ALTA
Viscosidad	18000 – 22000 cps	20000 cps	MEDIA
pH	7 +/- 0,25	7	MEDIA
Esterilidad	Estéril	Estéril	MEDIA

Estabilidad	No menos de 95% en 2 años	No menos de 95% en 2 años	ALTA
Tiempos de procesos	4 - 5 HORAS	4 HORAS	MEDIA

Tabla 3: Evaluación de los atributos críticos de calidad y su impacto en la fórmula:

ATRIBUTO CRITICO DE CALIDAD	Atributo 1	Atributo 2	Atributo 3	Atributo 4	Criticidad de impacto
Criticidad	Homogeneidad	Viscosidad	Eficacia	Seguridad	
Impacto de los componentes de la formulación					
Aceite mineral	9	9	3	3	729
Metilparabeno	1	1	3	3	9
Propilparabeno	1	1	3	3	9
Petrolato blanco	9	9	3	3	729
Tioconazol	1	1	9	3	27
Impacto de las etapas de fabricación					
Mezcla aceite mineral y principio activo (etapa 1)	3	-	-	-	3
Mezcla etapa 1 con petrolato	3	-	-	-	3
Adición de conservadores	1	-	-	-	1
Homogenización y Enrase	9	-	-	-	9

CRITICIDAD	IMPACTO
1= BAJA	1= BAJO
3=MEDIA	3=MEDIO
9=ALTA	9=ALTO

3. Los Parámetros Críticos de Calidad:

Los parámetros críticos de calidad son: tiempo de agitación, temperatura y revoluciones por minuto (RPM) del agitador para obtener un ungüento homogéneo.

El tioconazol utilizado como materia prima proviene de la India y su certificado analítico esta adjunto en anexos.

Los ungüentos oftálmicos al tener bases oleosas son formulas donde el principio activo y excipientes se dispersan por lo que el grado de solubilidad de dichas materias primas no son relevantes. Una dispersión farmacéutica es una forma de presentación de un fármaco en la que las partículas del principio activo se dispersan en un medio dispersante. Esta dispersión puede ser sólida, líquida o semisólida y puede contener uno o más principios activos junto con una variedad de excipientes que ayudan a mantener la estabilidad y la uniformidad de la dispersión. En este estudio solo utilizamos un principio activo y como vehículos el petrolato blanco y aceite mineral, para lo cual se hicieron pruebas de pre formulación para encontrar la proporción de ellos y llegar a una proporción donde la viscosidad llegue a 20000 cps +/- 2000.

Tabla 4: Pruebas de preformulación para llegar al porcentaje de proporciones.

Ensayo	% Petrolato Blanco	% Aceite Mineral	Viscosidad
1	30	70	8754 cps
2	50	50	12455 cps
3	70	30	19989 cps

Las fórmulas definidas considerando las pruebas de preformulación se muestran a continuación:

- a. Tioconazol 6,5% ungüento oftálmico:

Tabla 5: Formula tioconazol 6,5% ungüento oftálmico.

Nombre	Tipo	Concentración	Unidad de medida

Tioconazol	Principio Activo	6,5	g
Aceite Mineral	Excipiente	30	g
Metilparabeno	Excipiente	0,05	g
Propilparabeno	Excipiente	0,01	g
Petrolato Blanco c.s.p.	Excipiente	100	g

b. Tioconazol 3% ungüento oftálmico:

Tabla 6: Formula de tioconazol 3 % ungüento oftálmico.

Nombre	Tipo	Concentración	Unidad de medida
Tioconazol	Principio Activo	3	g
Aceite Mineral	Excipiente	30	g
Metilparabeno	Excipiente	0,05	g
Propilparabeno	Excipiente	0,01	g
Petrolato Blanco c.s.p.	Excipiente	100	g

c. Tioconazol 1% ungüento oftálmico:

Tabla 7: Formula de tioconazol 1 % ungüento oftálmico.

Nombre	Tipo	Concentración	Unidad de medida
--------	------	---------------	------------------

Tioconazol	Principio Activo	1	g
Aceite Mineral	Excipiente	30	g
Metilparabeno	Excipiente	0,05	g
Propilparabeno	Excipiente	0,01	g
Petrolato Blanco c.s.p.	Excipiente	100	g

La elaboración del ungüento oftálmico, se realizó en tanque piloto de 3 litros de capacidad que cuenta con sistema de agitación y esterilización (31), además de una maquina envasadora de tubos trilaminados que previamente fueron esterilizados, a fin de asegurar la calidad y esterilidad del producto. Las operaciones del proceso, se hizo bajo condiciones estériles en áreas clasificadas, bajos los requerimientos de las Buenas Prácticas de Manufactura (32). Para el ensayo de control, se preparó un placebo las cuales contiene todos los excipientes de la formula menos el principio activo y se utilizó el mismo proceso y equipos para la fabricación.

4. Pruebas de calidad del ungüento oftálmico:

El producto desarrollado paso por una evaluación de sus atributos generales de Calidad (33), entre ellas tenemos: 4.1 Descripción: es una descripción cualitativa del medicamento.

4.1 Identificación: Las pruebas de identificación se realizaron para identificar el activo por cromatografía liquida de alta resolución comparando los tiempos de retención del pico del estándar con los de la muestra según las cuales se hicieron en el método de valoración de principio activo.

4.2 pH: el ojo humano puede tolerar pH entre 3 y 8,6 aproximadamente, el valor del pH debe ser aquel en la que el producto sea más estable. Los valores de pH de se midieron solubilizando el ungüento en agua en concentraciones de 1%, 5% y 10 % utilizando medidor de pH digital previamente calibrado (34) (31).

4.3 Esterilidad: Las formas farmacéuticas oftálmicas deben cumplir los requisitos de esterilidad, los envases y el producto deben ser estériles al momento del llenado y sellado (33). Para la prueba de esterilidad se usó los métodos del capítulo 71 de la farmacopea americana (33).

4.4 La valoración: Se realizó con un método analítico de Cromatografía Líquida de Alta Resolución que a continuación se detalla con uso del cromatógrafo líquido de alta resolución (HPLC), la fase móvil utilizada fue buffer pH 7,4: metanol (1:4), se preparó el buffer pH 7,4: Disolver 1,7g de fosfato tetrabutilamonio monobásico en 1L de agua purificada y se ajustó el pH 7,4 con hidróxido de amonio 2M. El sistema cromatográfico utilizo la columna: L1 Symmetry C18 5um 250x4,6mm, el detector UV a 218nm, el flujo: 1,0 mL/min, con volumen de inyección: 20µL y temperatura: 25°C. La preparación del Estándar se hizo transfiriendo a un matraz volumétrico de 50 mL aproximadamente 10mg Tioconazol que se disolvió y llevo a volumen con fase móvil, luego se filtró con filtro de nylon de 0,45µm. En cuanto a la preparación de las muestras, se pesó con exactitud en un vaso de precipitados de 150mL aproximadamente 0,15g de ungüento, Se agregó 15 mL de fase móvil y calentándolo a 60 °C por 1 minuto. Se dejó enfriar y transfirió la fase acuosa a una fiola de 50mL. Se repitió la extracción dos veces más. Se diluyo con fase móvil a volumen y finalmente se filtró con filtro de nylon de 0,45µm. Para Los cálculos del porcentaje de Tioconazol por 100g de ungüento oftálmico se utilizó la siguiente formula:

$$\text{g/100g Tioconazol} = (\text{Am}/\text{Ast}) \times (\text{Pst}/\text{Pm}) \times \text{Dil} \times (\text{Pot st}/1000)$$

Donde:

Am= Área del pico correspondiente al tioconazol en el

Ast= Área del pico correspondiente a tioconazol en el cromatograma de preparación del estándar.

Pst= Peso del estándar de tioconazol en mg

Pm= Peso del ungüento analizado

Dil= Diluciones del estándar y muestra

Pot st= Potencia del estándar del tioconazol en porcentaje

5. Validación del método analítico:

Con el fin de garantizar la confiabilidad de los resultados, el método analítico fue validado cuyos parámetros fueron: selectividad, linealidad, precisión, exactitud, robustez y rango. Los criterios de aceptación y método fueron:

5.1 SELECTIVIDAD: Para la determinación de interferencias de los demás componentes (placebo): La solución de estándar: se preparó la solución estándar de acuerdo al método analítico propio. El placebo se preparó como una muestra problema de acuerdo a las fórmulas determinadas. La muestra se preparó pesando 0,15g de tioconazol 6,5% y seguir el método analítico antes descrito. Se inyectó la muestra por triplicado al cromatógrafo líquido de alta resolución y se determinó la respuesta obtenida en el placebo y en la muestra al 100%. El criterio de aceptación fue que el resultado de análisis del placebo no debe dar una respuesta cuantificable (es decir menor al 1% de la respuesta del estándar) y el resultado de análisis de la muestra al 100% debe estar entre 90%-110%. Esto indica que los demás

componentes no interfieren en el análisis del principio activo. Para la determinación de productos de degradación a partir de la muestra al 100% antes de llevar a volumen, se sometió la muestra a condiciones forzadas con: hidrólisis alcalina tratando 0,15 g de muestra con 1mL de NaOH 1N y llevando a $80^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ por 1 hora, se enfrió y siguió el método analítico. Para la Hidrólisis ácida se tratar 0,15g de muestra con 1mL de HCl 1N, llevando a $80^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ por 1 hora y siguió el método analítico. La termólisis se ejecutó con 0,15 g de muestra a 100°C por 5 horas, se enfrió y siguió el método analítico. La fotólisis se hizo exponiendo 0,15g de muestra a la luz UV 254 nm por 5 horas y siguió el método analítico. La oxidación se hizo tratando 0,15g de muestra con 1mL de H_2O_2 al 30%, sometiéndolo a calentamiento en baño maría por una hora, se enfrió y siguió el método analítico. Se inyectar la muestra por triplicado al HPLC y se verifica si hay aparición de picos de productos de degradación. El criterio de aceptación fue la resolución entre el pico del activo y el resto de picos de posibles sustancias de degradación es mayor o igual a 1.

5.2 LINEALIDAD: se desarrollaron: linealidad del sistema que debe partir de una solución stock de patrón, la cual se obtuvo pesando aproximadamente 20 mg de tioconazol estándar secundario, vertiéndolo en un matraz volumétrico de 50 mL, disolviendo con fase móvil y llevando a volumen. Se preparó por triplicado 5 diluciones de esta solución correspondientes al 80%, 90%, 100%, 110% y 120%, para lo cual se tomó 4mL en 10mL (80%), 9mL en 20mL (90%), 5mL en 10mL (100%), 11mL en 20mL (110%), 6mL en 10mL (120%). Se diluyo a volumen con diluyente y se filtró con filtro de nylon de $0,45\ \mu\text{m}$. Se preparó 3 muestras por cada concentración, se efectuó el análisis por triplicado y se determinar la curva de correlación $y=bx+a$. La linealidad del método: se preparó una solución stock de

patrón, la cual se obtuvo pesando 20 mg de tioconazol y vertiéndolo en matraz volumétrico de 50 mL, se disolvió y diluyó a volumen con diluyente. Se preparó por triplicado 3 diluciones a partir de un placebo con el principio activo, correspondientes al 80%, 100% y 120% de la concentración teórica de 0,2mg/ mL para lo cual se toman 4 mL en 10 mL; 5 mL en 10 mL y 6 mL en 10 mL de solución stock; se incorporó 0,15 g de placebo en los beakers de 100mL, y se siguió los pasos descritos en la técnica analítica propia. Se preparó 3 muestras por cada concentración, se efectuó el análisis por triplicado y se determinó la curva de correlación $y=bx+a$. Para la interpretación estadística se determinó: coeficiente de correlación, coeficiente de determinación, homocedasticidad, normalidad de los residuales, test de Cochran, test de verificación de la pendiente o de la linealidad (prueba de t de student, coeficiente de variación, intervalo de confianza), test de verificación de la variable independiente o de la proporcionalidad (prueba de t de student, intervalo de confianza) y el coeficiente de variación de los factores de respuesta. Los criterios de aceptación: coeficiente de correlación: $r > 0,999$, coeficiente de determinación: $r^2 > 0,990$, homocedasticidad: La distribución de los puntos debería ser aleatoria y no reflejar ninguna tendencia, Normalidad de los residuales: $F_{1exp} > F_{1tabla}$, $F_{2exp} < F_{2tabla}$, Test de Cochran: $G_{exp} < G_{tabla}$, test de verificación de la pendiente o de la linealidad (prueba de t de student, coeficiente de variación, intervalo de confianza): $RSD \leq 2\%$, $t_{exp} > t_{tabla}$, el intervalo de confianza no incluye el cero, test de verificación de la variable independiente o de la proporcionalidad (prueba de t de student, intervalo de confianza): $t_{exp} < t_{tabla}$, el intervalo de confianza incluye el cero, coeficiente de variación de los factores de respuesta): $RSD \leq 2\%$.

5.3 PRECISIÓN: Para la precisión del sistema, se preparó una solución estándar al 100% y analizo por 6 veces en forma consecutiva para lo cual se registró las respuestas y los parámetros para la idoneidad del sistema (número de platos teóricos, asimetría, resolución). Los criterios de aceptación: El C.V. no es más del 2%. En cuanto a la precisión del método (Repetibilidad): se tomó como muestra el lote: 10718 del producto Tioconazol 6,5% Ungüento Oftálmico, se preparó 06 muestras independientes según método analítico para determinar los límites de confianza de los resultados individuales, resultados promedio. El coeficiente de variación (CV) de las respuestas obtenidas. Los criterios de aceptación: fueron no más de 2% del CV. Para la precisión intermedia, un analista B, procedió a repetir los pasos descritos en repetibilidad, empleando el mismo lote como muestra. Se efectuó el análisis preparando 6 muestras independientes según método analítico. Se determino los límites de confianza de los resultados individuales y resultados promedio. También se determinó el CV de las respuestas obtenidas en repetibilidad del analista A conjuntamente con las del analista B. El criterio de aceptación fue que CV no es más de 4%.

5.4 EXACTITUD: Se preparó por triplicado 3 diluciones a partir de un placebo con principio activo, correspondientes al 80%, 100% y 120% de la concentración teórica referencial de 0,2 mg/mL, se utilizó las muestras obtenidas en la linealidad de método, se efectuó el análisis por triplicado. Se determinó el porcentaje de recuperación, el coeficiente de variación, el test de Cochran determinando el G_{exp} . el t de Student. Los Criterio de aceptación fueron los límites del porcentaje recuperado que es de 97% a 103% y su coeficiente de variación no debe exceder a 1,5%. La $G_{exp} < G_{tabla}$ para una probabilidad del 95% ($p=0.05$) y $K=5$, $n=3$, se acepta la hipótesis nula (H_0), entonces las varianzas no son estadísticamente

diferentes entre sí. El $t_{exp} < t_{tablas}$ no existe diferencia significativa entre la recuperación media y 100, confirmado la buena exactitud del método.

5.5 ROBUSTEZ: Se definió los 07 factores de influencia en el análisis a utilizar en los diseños factoriales de Youden-Steiner, se determinó los valores alternativos a emplear en este ensayo para cada uno de los 07 factores: numero de extracciones (A, a), tiempo de agitación (B, b), temperatura de baño maría (C, c), tipo de filtro (D, d), temperatura del horno de columna (E, e), composición de fase móvil (F, f), marca de columna (G, g).

Para ello se preparó las 7 muestras o los 7 experimentos basados en la tabla posterior, se efectuó el análisis y las inyecciones por triplicado y se determinó la diferencia entre los promedios de los valores de respuesta del experimento de la muestra al 100% con respecto a los demás experimentos y los efectos de cada factor. El criterio de aceptación fue la diferencia máxima entre los promedios debe ser menor o igual a 2%. Las diferencias más elevadas indicarán que los factores correspondientes tienen mayor influencia que el resto sobre la precisión del método. Se elaboró la tabla de diseños factoriales de Youden-Steiner de la siguiente manera:

Tabla 8: tabla de diseños factoriales de Youden-Steiner

Factor	Valor D (Nominal)	Factor	Valor d (Alternativo)
A	3	a	2
B	60''	b	50''
C	60°C	c	50°C
D	Nylon	d	PVDF
E	25°C	e	30°C

F	Fase móvil 100%	f	Fase móvil + 2%
	Metanol		
G	Waters	g	Merck

5.6 RANGO: Es el intervalo entre la concentración superior e inferior de analito para el cual se ha demostrado la correcta precisión, exactitud y linealidad del método. El criterio de aceptación fue: El método debe ser preciso, exacto y lineal incluyendo el nivel superior e inferior de la concentración. La referencia del método analítico fueron la farmacopea Británica 2019 – Tioconazol crema y validación de métodos analíticos AEFI 2001.

6. Estudio de estabilidad:

El estudio de estabilidad acelerada se realizó por 6 meses bajo la normativa de la ICH (Conferencia Internacional sobre armonización) y la Directiva de Estabilidades de Perú a $40 \text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2 \text{ }^{\circ}\text{C}$ a $75 \pm 5\%$ de HR durante 60 días (0, 30 y 60 días). Los parámetros son: La descripción o Aspecto, el pH y el porcentaje de contenido de fármaco o valoración (34).

7. Evaluación de la Actividad Fúngica:

La actividad antifúngica de todas las formulaciones se evaluó contra la cepa *Candida albicans* por el método de método de difusión en disco de papel (25), para lo cual se procedió con lo siguiente: Preparación de la Solución Buffer: Se disolvió 1,7 g de tetrabutilamonio dihidrógeno ortofosfato en 1L de agua purificada. Se ajustó el pH a $7,4 \pm 0,2$ con hidróxido de amonio 2M. Esterilizar a 121°C x 30 min. La solución muestra: se preparó pesando exactamente una determinada cantidad de muestra e incorporarlo en un tubo conteniendo solución Buffer, se calentó a 60°C , con ayuda de un vortex se agitó la mezcla por aproximadamente 1 min, se observó

que la mayor parte de unguento se adhiere a las paredes del tubo. Se dejó enfriar y transfirió la parte acuosa a otro recipiente. Para la reactivación y dilución de microorganismos, se utilizó la cepa *Candida albicans* ATCC 10231, Esta cepa se sembró en toda la superficie de una placa de agar malta levadura, se incubo a una temperatura de 20-25°C por 2 a 5 días. Después de incubar, recolecto el microorganismo de las placas con aproximadamente 9 mL de solución salina estéril usando un asa de siembra. Se pipeteo y transfirió la suspensión a un tubo de vidrio estéril. Ésta es la suspensión de recolección, se diluyo aproximadamente 1 mL de la suspensión de recolección con 9 mL de solución salina estéril. Usando el espectrofotómetro de UV-visible, se midió el % de transmitancia a 580 nm. El valor deseado fue aproximadamente 25% de transmitancia a 580 nm. Con ayuda de una micropipeta, se tomó 0,2 mL de esta suspensión y se agregó en 100 mL de agar malta levadura licuado y mantenido a 45°C aproximadamente. Se agregó el medio inoculado en placas Petri. La preparación de las placas: se usaron placas de 20x90 mm y 20x100mm, a las cuales se les agrego 17 y 21 mL respectivamente de agar malta levadura sin inóculo, como base; y 4 mL de medio con inóculo, como capa para ambos tipos de placa. Se espero 20 minutos aproximadamente para que el medio solidifique. La preparación de los cilindros: se hizo con cilindros de acero quirúrgico y tienen las siguientes medidas: 8 mm de diámetro externo, 6 mm de diámetro interno y 10 mm de longitud. Estas dimensiones tienen una tolerancia de ± 0.1 mm. Se esterilizo por calor seco y dentro de un recipiente debidamente cerrado. La preparación del sacabocado se hizo con material de acero quirúrgico y la punta de penetración del medio tuvo las siguientes medidas aproximadas: 8 mm de diámetro externo, 7.4 mm de diámetro interno. Se esterilizo por calor seco debidamente envueltos. El enfrentamiento: se hizo por el método excavación en

placa, en una placa con medio inoculado, con el sacabocado se punzo el medio hasta un máximo de 6 puntos ubicados de manera equidistante. Se retiro las porciones de agar con ayuda de una aguja estéril y se inocularon las cavidades con 25 a 100 uL de muestra a evaluar. Según la especificación suministrada por MTCC (Microbial Type Culture Collection), el período de incubación es de 2 días. Después del período especificado de incubación, la zona clara de inhibición (ZOI) en cada placa petri se mide en milímetros (35).

8. **Test de Irritation ocular in Vivo (Drained test in rabbit):**

Las formulaciones fueron evaluadas in vivo en modelo animal (conejos) para determinar los efectos adversos que ocurrirán en una exposición de la muestra de prueba dentro de las 72 horas de evaluación hasta los 21 días para la prueba de irritación/corrosión aguda ocular del producto tioconazol ungüento oftálmico (1%, 3% y 6,%). El potencial de irritación ocular de una sustancia se evalúa sobre la base de su capacidad para causar lesiones en la córnea, el iris y la conjuntiva, en la aplicación al ojo (34). Los métodos y principios para evaluar dos categorías de peligros, la toxicidad sistémica aguda y la irritación ocular, ambas resultantes de una exposición única o de muy corto plazo (36). Se utilizaron conejos albinos sanos, de la cepa New Zeland. El desarrollo de la prueba se da con la aplicación de la muestra en una dosis única en uno de los ojos, mientras el ojo no tratado sirve como control. Luego de la aplicación se observaron a los animales durante 1 hora, 24, 48 y 72 horas, 7, 14 y 21 días para ver si se produce lesiones o daño durante el estudio. Se realizaron observaciones diarias para encontrar efectos en el ojo y efectos sistémicos adversos. Se hizo control visual del consumo de agua y alimento administrado ad libitum. El peso corporal de los animales se registró al inicio, a los siete días y al final del estudio según procedimientos del laboratorio.

Animales: Para el ensayo se usaron conejos albinos machos sanos, de la cepa New Zeland de 6 – 8 semanas de edad con un peso promedio de 2.0 – 2.5 Kg. Dada la procedencia de los animales, en el presente ensayo, se procedió al proceso de cuarentena de cinco días. En tal virtud, los animales fueron colocados en el lugar destinado para tal fin. La alimentación se realizó con alimento balanceado y agua ad libitum. El cuidado de los animales usados durante la prueba cumple con las directrices aceptadas en las normas o guías internacionales para el cuidado y manejo de animales de experimentación. El control de las condiciones ambientales y las técnicas adecuadas del cuidado animal son necesarios para dar resultados significativos. El total de animales usados fue de 3. Uno en la prueba inicial y dos en la prueba confirmatoria.

Preparación de los Animales: Ambos ojos de cada conejo experimental provisionalmente seleccionado para el ensayo, es examinado dentro de las 24 horas antes del inicio de la prueba. Los animales que muestren irritación en el ojo, defectos oculares o lesiones corneales no son usados.

Alojamiento y Condiciones Ambientales: Los conejos se encuentran en jaulas individuales. El ensayo se desarrolló en el ambiente de experimentación de conejos del área de modelos biológicos y toxicológicos del servicio de control de calidad de la Universidad Peruana Cayetano Heredia. La temperatura del ambiente está en el rango de 20 – 25°C, la humedad relativa entre 30 – 70%. La secuencia del fotoperiodo es 12 horas luz, 12 horas oscuridad. El alimento usado es balanceado, especial para conejos, provenientes de la empresa Purina.

VARIABLES: Las variables registradas durante el ensayo correspondieron a: lesiones y efectos tóxicos y sistémicos producidos por la aplicación única por la vía ocular

del producto. Diariamente se realizó registro de la presencia de animales muertos por tratamiento. Evaluación de signos clínicos. Observación de los ojos ensayados hasta los 21 días (duración de la prueba).

Procedimiento:

Administración de la muestra: se instiló 0,1 mL de la muestra en el saco conjuntival de un ojo de cada animal, alejando el párpado inferior del globo ocular. Los párpados se mantienen juntos suavemente durante un segundo para evitar la pérdida de material. El otro ojo que es el no tratado, sirvió como control.

Irrigación: Los ojos no fueron lavados después de la instilación de la muestra en las primeras 24 horas, ya que fue removida por mecanismos fisiológicos de los animales.

Test Inicial: Se realizó en un solo conejo. Se registraron los grados de las observaciones realizadas.

Test Confirmatorio: Se realizó en dos conejos. Se anotaron los grados de reacción como en el test inicial.

Período de observación: Se evaluó la reversibilidad de los efectos. El período es hasta los 21 días. Las evaluaciones se realizaron diariamente, en especial los primeros 72 horas (1 h, 24 h, 48 h, 72 h, 7, 14 y 21 días).

Para la evaluación de resultados usamos la siguiente tabla:

Tabla 9: Cuadro de Evaluación

Cuadro de Evaluación

CORNEA:	
Opacidad (Lectura que podrían ser tomadas del área más densa)	
Grado de Densidad	
Sin ulceración, sin opacidad	0
Área dispersa o difusa, detalles claramente visibles	1
Área translúcida fácilmente perceptible, detalles del iris ligeramente oscurecido	2
Áreas opalescentes, sin detalles visibles del iris	3
Opaco	4
IRIS:	
Normal	0
Pliegues encima de lo normal, congestión, inflamación, inyección circuncorneal, iris que reacciona todavía a la luz	1
Ninguna reacción a la luz, hemorragia, destrucción total	2
CONJUNTIVA:	
Enrojecimiento (referido a la conjuntiva palpebral y bulbar, excluyendo la córnea y el iris)	
Normal.....	0
Presencia de vesículas	1
Difusa, enrojecimiento	2
Rojo difuso	3

Norma Técnica: Guía OECD (Organization for Economic Co-operation and Development) – Test 405.

9. Eficacia o Evaluación biofarmacéutica de las formas de dosificación oftálmica: In Vitro

Las técnicas “*in vitro*” se utilizó la denominada celda de difusión de Franz que se utiliza para preparados líquidos y semisólidos, esta es la que a través de membranas sintéticas o córneas aisladas de cerdo montadas en dicho dispositivo nos dio información sobre los efectos que la naturaleza del fármaco (lipofilia/hidrofilia), tamaño molecular, grado de ionización, o componentes de la formulación, ejercen en la permeabilidad o permeación ocular. No obstante, al no incluir los procesos de pérdida tras aplicar la formulación en el ojo, no pueden predecir con absoluta fiabilidad la biodisponibilidad *in vivo* de medicamentos administrados tópicamente (37). Los estudios de permeación se llevaron a cabo utilizando celdas de difusión de Franz colocando en el compartimento donador, se colocan aproximadamente 200 mg de la muestra en estudio; y en el compartimento receptor, sometido a 500 rpm, 10 mL de solución receptora. Ambas soluciones están sometidas a una agitación y la temperatura de las celdas se mantiene a 33 °C con ayuda de un baño de agua termostatzado. La superficie de la membrana expuesta al proceso de permeación en las celdas de Franz utilizada es de 0,0154 cm². Para realizar el ensayo se tomó muestras de 0,5 mL del compartimento receptor a intervalos de tiempo predeterminados La extracción de cada alícuota se realizó cuidadosamente para no generar burbujas en el medio, reponiendo inmediatamente el volumen con el mismo medio existente en el compartimento receptor. Los parámetros calculados para comparar todos los perfiles de permeación fueron los siguientes:

- Porcentaje permeado (%P): es la relación entre la cantidad total de fármaco en el compartimento donador y la cantidad permeada medida en el receptor, expresada en % tras 5 horas de ensayo.

- Flujo en estado estacionario (J_{ss}): Es la cantidad máxima de fármaco permeado por unidad de superficie y unidad de tiempo. Se calcula a partir del cociente entre la cantidad de fármaco permeado por unidad de área en el estado estacionario (asíntota de la curva) y el tiempo necesario para alcanzar dicha asíntota, según viene definido por siguiente relación:

$$J = dQ / A dt$$

Donde Q indica la cantidad de fármaco permeada (mg), A es el área de difusión (cm^2), y t es el tiempo de exposición (h).

- Coeficiente de permeación (P): se define como la relación entre el flujo y la concentración de partida en el compartimento donador, sus unidades son (cm/s) y se calcula según la siguiente ecuación:

$$P = J / C_0 \times 60 \times 60$$

Donde C_0 es la concentración de fármaco en el medio donador en (mg/cm^3)(37).

Preparación de las Corneas:

Los globos oculares de los cerdos se mantuvieron en frío (4°C) en solución salina a 1 hora del sacrificio. Las córneas se diseccionan cuidadosamente junto con 2–4 mm. del tejido de la esclerótica circundante del globo ocular y se lavó con solución salina fría para eliminar cualquier pigmento adherido. La córnea lavada se conserva buffer de pH 7,4 recién preparada con composición: % p / v de NaCl: 0,57 g, NaHCO_3 : 0,361 g, KCl: 0,04 g, K_2HPO_4 : 0,023 g, MgSO_4 —0,007 g y CaCl_2 —0,08 g en agua destilada y con burbujeo con O_2 para mantener la córnea en un estado viable (38).

10. Eficacia o Evaluación Biofarmacéutica de las Formas de Dosificación Oftálmica: In Vivo

Para la evaluación de las fórmulas del ungüento oftálmico, se utilizaron conejos en cuyo ojo izquierdo se indujo a queratitis micótica o fúngica, para ellos se aplicó la anestesia general en los animales con ketamina intramuscular (35mg / kg) y la xilazina (5mg / kg)(39), La anestesia corneal se realizó con preparaciones tópicas de proparacaína al 0.5 %. El inóculo se prepara activando en agar sabouraud la especie: *Candida albicans*, se tomaron las unidades formadoras de colonias y se re suspendieron en solución fisiológica estéril para producir el inóculo final de alrededor de $8,6 \times 10^4$ unidades formadoras de colonias (UFC)/mL (40). Se aplica mediante la inyección de 0,1 mL de una suspensión de *Candida albicans* ($8,6 \times 10^4$ UFC/0,1 mL) intraestromal en el centro de la córnea. Después de 3 días de inicia la infección, comenzó el tratamiento (40). Para la aplicación de dicho inóculo, se contó con el soporte técnico del médico oftalmólogo Dra. Marleni Mendoza Cabanillas (CMP N° 44865 RNE 31027).

El tratamiento fue aplicando aproximadamente 1 cm de tioconazol ungüento oftálmico 4 veces por día (8:00 am, 12:00 am, 4:00 pm 8:00 pm) durante 7 días en el ojo afectado, utilizando las diferentes concentraciones de la nueva fórmula, así mismo, el placebo también se aplicará a su grupo respectivo con misma frecuencia y cantidad de ungüento. El sistema de puntuación y/o evaluación clínica, se realizó bajo el soporte del médico oftalmólogo especialista en cornea Dr. Luis Mesias Costilla (CMP N° 13219 R.N.E. 6020), según se indica en el cuadro de operacionalización de variables.

Animales: para el ensayo se usaron conejos albinos machos sanos, de la cepa New Zeland de 6 – 8 semanas de edad con un peso promedio de 2,0 – 2,5c Kg. Dada la procedencia de los animales, en el presente ensayo, se procedió al proceso de cuarentena de cinco días. En tal virtud, los animales fueron colocados en el lugar destinado para tal fin. La alimentación se realizó con alimento balanceado y agua ad libitum. El cuidado de los animales usados durante la prueba cumple con las directrices aceptadas en las normas o guías internacionales para el cuidado y manejo de animales de experimentación. El control de las condiciones ambientales y las técnicas adecuadas del cuidado animal son necesarios para dar resultados significativos. El total de animales usados fue de 28. Tres grupos de 7 para el tratamiento con la muestra y un grupo con el placebo.

Preparación de los Animales: son usados animales saludables y con los ojos en óptimas condiciones.

Alojamiento y condiciones ambientales: Los conejos fueron ubicados en jaulas individuales. El ensayo se desarrolló en el ambiente de experimentación de conejos del área de modelos biológicos y toxicológicos del servicio de control de calidad de la Universidad Peruana Cayetano Heredia. La temperatura del ambiente está en el rango de 20 – 25°C, la humedad relativa entre 30 – 70%. La secuencia del fotoperiodo es 12 horas luz, 12 horas oscuridad. Los animales fueron alimentados con alimento balanceado, especial para conejos, provenientes de la Universidad Agraria La Molina. Al final todos los animales fueron sacrificados después de séptimo día de iniciado el tratamiento utilizando pentobarbital sódico por vía intraperitoneal en dos etapas (41): Pre-eutanasia a una dosis de 40 mg/kg, y después de 15 minutos, la eutanasia a una dosis de 200 mg/kg. Reduciendo de ese modo el estrés causado por la manipulación.

11. **Evaluación histológica:**

La evaluación histológica de las córneas fue realizada lavándolas con solución isotónica de NaCl (0,9% p / v) durante 1 minuto con solución salina tamponada con fosfato (PBS), pH 7,4 y se incubó durante 30 minutos con las fórmulas de ungüentos a 34 ° C. Como control negativo se usa en buffer fosfato salino (PBS) y alcohol isopropílico al 75% como control positivo, ambos por separado. Las córneas se lavan con PBS, pH 7.4 y se fijan inmediatamente con una solución de formalina al 10% (v / v) durante 24 h. Las córneas se deshidratan con gradiente de alcohol etílico (70% –90% –100%) y xileno, se ponen en parafina fundida y se solidifican en forma de bloques. Luego, las secciones transversales (<1 mm) se colocan en un portaobjetos de vidrio y se observan al microscopio en busca de cambios histológicos después de la tinción con hematoxilina y eosina para el daño histológico. Se observó: ensanchamiento de los espacios intercelulares estrechos con deformación, distorsión de las células epiteliales superficiales y finalmente, desprendimiento del tejido en conjunto (42).

V.6. Análisis estadístico

Para el análisis de los resultados de la variable de infiltración o lesión ocular, se utilizó el test de ANOVA (38) y la comparación de parejas se hizo utilizando el método de Tukey, para lo cual se utilizó el programa estadístico SPSS 26.0 (Sun Microsystems, Inc., Santa Clara, California, Estados Unidos).

V.7. Consideraciones éticas

El proyecto de investigación se realizó siguiendo los lineamientos de bioética para el caso de animales de experimentación y cuenta con aprobación del comité de ética

para animales de la UPCH con numero de Constancia 002-12-18 al código de inscripción 103410.

VI. RESULTADOS

1. Desarrollo del ungüento oftálmico

Se formuló el Tioconazol 1%, 3% y 6,5c% ungüento oftálmico en bases oleosas que permitan su aplicación oftálmica y usando conservadores ampliamente conocidos que otorga buenos resultados, el proceso de fabricación siguió todos los lineamientos de las Buenas Prácticas de Manufactura las cuales la calidad de dichas formulaciones se demuestró con el análisis de dichas formulaciones y los estudios de estabilidad acelerada.

Tabla 10: Resultados de las fórmulas desarrolladas de tioconazol 1%, 3% y 6,5% ungüento oftálmico.

Pruebas Efectuadas	Especificaciones	TIOCONAZOL 1% Ungüento Oftálmico Lote: 10719	TIOCONAZOL 3% Ungüento Oftálmico Lote: 10729	TIOCONAZOL 6,5% Ungüento Oftálmico Lote: 10739
Aspecto:	Preparación de consistencia blanda, blanquecina, homogénea.	Conforme	Conforme	Conforme
Identificación	El tiempo de retención del pico principal en el cromatograma de la preparación de valoración se corresponde con el pico principal en el cromatograma de la preparación estándar según se obtiene en la cuantificación.	El tiempo de retención del pico principal en el cromatograma de la preparación de valoración se corresponde con el pico principal en el cromatograma de la preparación estándar según se obtiene en la cuantificación.	El tiempo de retención del pico principal en el cromatograma de la preparación de valoración se corresponde con el pico principal en el cromatograma de la preparación estándar según se obtiene en la cuantificación.	El tiempo de retención del pico principal en el cromatograma de la preparación de valoración se corresponde con el pico principal en el cromatograma de la preparación estándar según se obtiene en la cuantificación.
Cuantificación de Tioconazol	2,70 – 3,30 % 90,0 – 110,0 %	1,02 % 102,0 %	2,93 % 97,6 %	6,91 % 106,3 %
Cuantificación de Metilparabeno	0,040 – 0,060 % 80,0 – 120,0%	0,043 g/100g 86,0%	0,045 g/100g 90,0%	0,040 g/100g 80,0%
Cuantificación de Propilparabeno	0,008 – 0,012 % 80,0 – 120,0%	0,008 g/100g 80,0%	0,009 g/100g 90,0%	0,008 g/100g 80,0%
Esterilidad	Estéril	Estéril	Estéril	Estéril

La elaboración del ungüento oftálmico, se realizó en tanque piloto que cuenta con sistema de agitación y esterilización (31), además de una maquina envasadora de tubos trilaminados que previamente hayan sido esterilizados, a fin de asegurar la

calidad y esterilidad del producto. Las operaciones del proceso, se harán bajo condiciones estériles en áreas clasificadas, bajos los requerimientos de las Buenas Prácticas de Manufactura (32). Para el ensayo de control, se preparó un placebo las cuales contiene todos los excipientes de la formula menos el principio activo y se utilizó el mismo proceso y equipos para la fabricación.

2. Validación del método analítico de tioconazol

La idoneidad de las metodologías analíticas se evidencia con su validación. Se realizo bajo las recomendaciones de la NTS N° 147-MINSA/2019/DIGEMID validación de técnicas analíticas propias. Con los resultados de la validación del método analítico cuyos parámetros fueron: Selectividad, Linealidad, Precisión, Exactitud, Robustez y Rango, podemos confirmar que dicha metodología está debidamente Validada.

Los resultados fueron:

Selectividad:

1.1.1. Determinación de interferencias de los excipientes:

1.1.1.1. El coeficiente de variación del St_1 es conforme:

$$\boxed{C.V. = 0,71 \%} \quad (C.V. \leq 2\%)$$

1.1.1.2. Los Check estándares son conformes:

$$\boxed{Chst = 0,05\%} \quad (Chst \leq 1\%)$$

1.1.1.3. Los resultados de la muestra al 100% son conformes:

$$\boxed{\text{Concentración} = 6,495\%} \\ (5,85\% \leq \text{Concentración} \leq 7,15\%)$$

1.1.1.4. La respuesta obtenida del placebo es conforme:

$$\boxed{\text{Respuesta} = 0,0\%} \quad (\text{Respuesta} \leq 1\%)$$

1.1.2. Determinación de productos de degradación:

1.1.2.1. La muestra que sufre la hidrólisis ácida muestra 1 pico a los 3,48 minutos dando una resolución con el pico del Tioconazol respectivamente dentro de la especificación:

$$\text{Resolución} = 20,9 \quad (\text{Resolución} \geq 1)$$

(Resolución ≥ 1)

1.1.2.2. La muestra que sufre oxidación muestra 5 picos a los 1,70; 1,99; 2,38; 2,72 y 3,48 minutos dando una resolución con el pico del Tioconazol respectivamente dentro de la especificación.

$$\text{Resolución} = 20,55; 20,56; 20,55; 20,56; \text{ y } 20,56$$

(Resolución ≥ 1)

1.2. Linealidad:

1.2.1. Linealidad del Sistema:

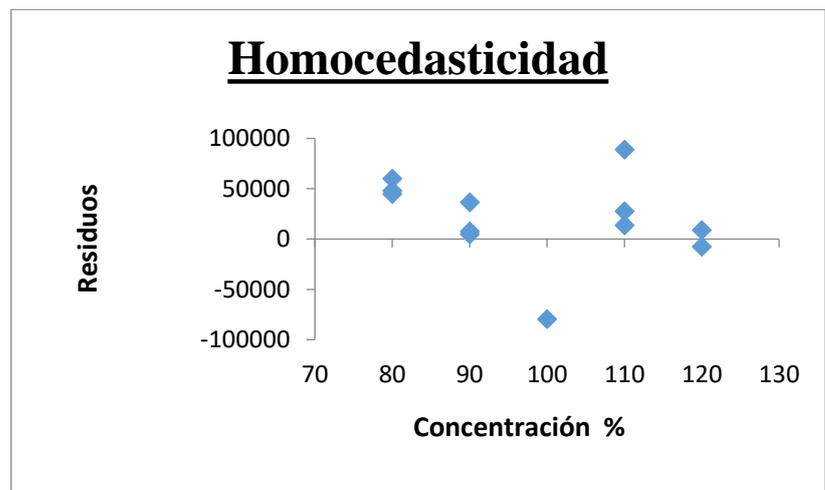
1.2.1.1. El coeficiente de correlación (r) es conforme:

$$r = 0,999 \quad (r \geq 0,999)$$

1.2.1.2. El coeficiente de determinación (r^2) es conforme:

$$r^2 = 0,997 \quad (r^2 \geq 0,990)$$

1.2.1.3. La Homocedasticidad es conforme, la distribución de los puntos es aleatoria y no refleja ninguna tendencia.



1.2.1.4. En la Normalidad de los residuales:

- El F_{1exp} es conforme.

$$F_{1\text{exp}} = 4837,79 \quad F_{1\text{tabla}} = 2,5 \quad (\alpha=0,05, n_n=4, n_d=70)$$

$$(F_{1\text{exp}} > F_{1\text{tabla}})$$

- El $F_{2\text{exp}}$ es conforme.

$$F_{2\text{exp}} = 1,36 \quad F_{2\text{tabla}} = 2,5 \quad (\alpha=0,05, n_n=4, n_d=70)$$

$$(F_{2\text{exp}} < F_{2\text{tabla}})$$

1.2.1.5. En el test de Cochran el G_{exp} es conforme.

$$G_{\text{exp}} = 0,4707 \quad G_{\text{tabla}} = 0,6838 \quad (\alpha=0,05, k=5, n=3)$$

$$(G_{\text{exp}} < G_{\text{tabla}})$$

1.2.1.6. En el test de verificación de la pendiente:

- El C.V. es conforme.

$$C.V. = 1,44\% \quad (C.V. \leq 2\%)$$

- El t_{exp} es conforme.

$$t_{\text{exp}} = 69,55 \quad t_{\text{tabla}} = 2,16 \quad (\alpha=0,05, n-2=13\text{gl})$$

$$(t_{\text{exp}} > t_{\text{tabla}})$$

- El intervalo de confianza es conforme ya que no incluye al cero.

$$\text{Límite inferior} = 110358,26$$

$$\text{Límite superior} = 117432,28$$

1.2.1.7. En el test de verificación de la variable independiente:

- El t_{exp} es conforme.

$$t_{\text{exp}} = 2,14 \quad t_{\text{tabla}} = 2,16 \quad (\alpha=0,05, n-2=13\text{gl})$$

$$(t_{\text{exp}} < t_{\text{tabla}})$$

- El intervalo de confianza es conforme ya que incluye al cero.

$$\text{Límite inferior} = -711930,60$$

$$\text{Límite superior} = 2509,94$$

1.2.1.8. El coeficiente de variación de los factores de respuesta es conforme.

$$\text{C.V.} = 0,86\% \quad (\text{C.V.} \leq 2\%)$$

1.2.2. Linealidad del Método:

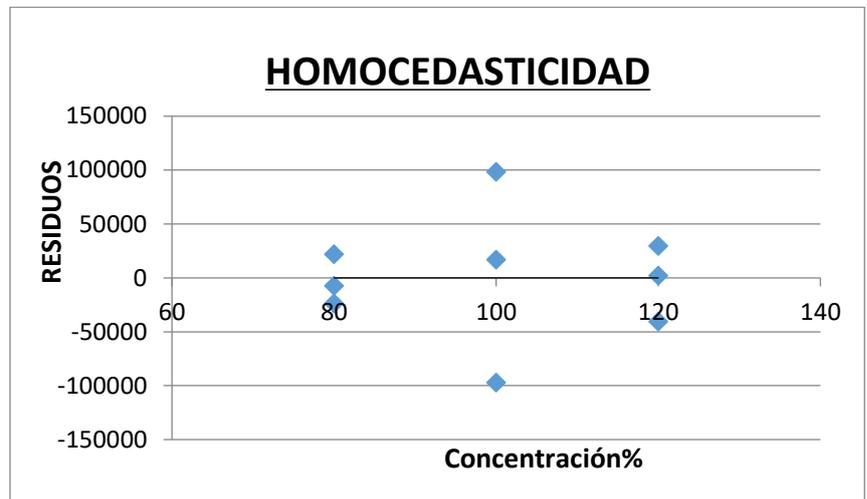
1.2.2.1. El coeficiente de correlación (r) es conforme.

$$r = 0,9996 \quad (r \geq 0,999)$$

1.2.2.2. El coeficiente de determinación (r^2) es conforme.

$$r^2 = 0,9992 \quad (r^2 \geq 0,990)$$

1.2.2.3. La Homocedasticidad es conforme, la distribución de los puntos es aleatoria y no refleja ninguna tendencia.



1.2.2.4. En la Normalidad de los residuales:

- El $F_{1\text{exp}}$ es conforme.

$$F_{1\text{exp}} = 9235,13 \quad F_{1\text{tabla}} = 3,4 \quad (\alpha=0,05, n_n=2, n_d=24)$$
$$(F_{1\text{exp}} > F_{1\text{tabla}})$$

- El $F_{2\text{exp}}$ es conforme.

$$F_{2\text{exp}} = 0,03 \quad F_{2\text{tabla}} = 3,4 \quad (\alpha=0,05, n_n=2, n_d=24)$$
$$(F_{2\text{exp}} < F_{2\text{tabla}})$$

1.2.2.5. En el test de Cochran el G_{exp} es conforme.

$$G_{\text{exp}} = 0,40 \quad G_{\text{tabla}} = 0,8709 \quad (\alpha=0,05, k=3, n=3)$$
$$(G_{\text{exp}} < G_{\text{tabla}})$$

1.2.2.6. En el test de verificación de la pendiente:

- El C.V. es conforme.

$$\text{C.V.} = 1,04\% \quad (\text{C.V.} \leq 2\%)$$

- El t_{exp} es conforme.

$$t_{\text{exp}} = 96,10 \quad t_{\text{tabla}} = 2,365 \quad (\alpha=0,05, n-2=7\text{gl})$$

$$(t_{\text{exp}} > t_{\text{tabla}})$$

- El intervalo de confianza es conforme ya que no incluye al cero.

$$\text{Límite inferior} = 109647,49$$

$$\text{Límite superior} = 115180,482$$

1.2.2.7. En el test de verificación de la variable independiente:

- El t_{exp} es conforme.

$$t_{\text{exp}} = 1,5052 \quad t_{\text{tabla}} = 2,365 \quad (\alpha=0,05, n-2=7\text{gl})$$

$$(t_{\text{exp}} < t_{\text{tabla}})$$

- El intervalo de confianza es conforme ya que incluye al cero.

$$\text{Límite inferior} = -458718,41$$

$$\text{Límite superior} = 101912,63$$

1.2.2.8. El coeficiente de variación de los factores de respuesta es conforme.

$$\text{C.V.} = 0,57\% \quad (\text{C.V.} \leq 2\%)$$

1.3. Precisión:

1.3.1. Precisión del Sistema:

1.3.1.1. El área promedio de las 06 inyecciones de estándar fue de 11126354 con un C.V. conforme.

$$\text{C.V.} = 0,16\% \quad (\text{C.V.} \leq 2\%)$$

1.3.1.2. El tiempo de retención promedio de las 06 inyecciones de estándar fue de 7,74 minutos con un C.V. conforme.

$$\text{C.V.} = 0,18\% \quad (\text{C.V.} \leq 2\%)$$

1.3.1.3. Los platos teóricos promedio de las 06 inyecciones de estándar fue de 7251,67 con un C.V. conforme.

$$\text{C.V.} = 1,95\% \quad (\text{C.V.} \leq 2\%)$$

1.3.1.4. La asimetría promedio de las 06 inyecciones de estándar fue de 1,25875 con un C.V. conforme.

$$\text{C.V.} = 1,76\% \quad (\text{C.V.} \leq 2\%)$$

1.3.2. Precisión del Método (Repetibilidad):

1.3.2.1. El coeficiente de variación del St_1 es conforme.

$$\text{C.V.} = 0,16\% \quad (\text{C.V.} \leq 2\%)$$

1.3.2.2. Los Check estándares son conformes.

$$\text{Chst} = 0,26\% \quad (\text{Chst} \leq 1\%)$$

1.3.2.3. El Promedio de las concentraciones de las 06 muestras del lote 10718 de Tioconazol 6,5% Ungüento Oftálmico fue 6,6% Su C.V es conforme.

$$\text{C.V.} = 0,18\% \quad (\text{C.V.} \leq 2\%)$$

1.3.2.4. Los límites de confianza individual y promedio son:

$$\text{Confianza individual} = 6,60\% \pm 0,0311\%$$

$$\text{Confianza promedio} = 6,60\% \pm 0,0127\%$$

1.3.3. Precisión del Método (Precisión Intermedia):

1.3.3.1. El coeficiente de variación del St_1 es conforme.

$$\text{C.V.} = 0,14\% \quad (\text{C.V.} \leq 2\%)$$

1.3.3.2. Los Check estándares fueron conformes.

$$\text{Chkst} = 0,11\% \quad (\text{Chkst} \leq 1\%)$$

1.3.3.3. El Promedio de las concentraciones de las 12 muestras del lote de Tioconazol 6,5% Ungüento Oftálmico. Su Desvest fue 0,083%, es conforme.

$$\text{C.V.} = 1,27\% \quad (\text{C.V.} \leq 4\%)$$

1.3.3.4. Los límites de confianza individual y promedio son:

$$\text{Confianza individual} = 6,53\% \pm 0,1829\%$$

$$\text{Confianza promedio} = 6,53\% \pm 0,0528\%$$

1.4. Exactitud:

1.4.1. El coeficiente de variación del St_1 fue 0,14%, siendo la especificación $\leq 2\%$.

$$\text{C.V.} = 0,14\% \quad (\text{C.V.} \leq 2\%)$$

1.4.2. Los Check estándares fueron en promedio 0,11%, siendo la especificación $\leq 1\%$.

$$\text{Chst} = 0,11\% \quad (\text{Chst} \leq 1\%)$$

1.4.3. El porcentaje de recuperación es conforme.

$$\% \text{ Recuperación} = 100,39\% \quad (97,0\% \leq \% \text{ recuperación} \leq 103,0\%)$$

1.4.4. El C.V. es conforme.

$$\text{C.V.} = 0,57\% \quad (\text{C.V.} \leq 1,5\%)$$

1.4.5. El t_{exp} es conforme.

$$t_{\text{exp}} = 0,02 \quad t_{\text{tabla}} = 2,306 \quad (\alpha=0.05, n-1=8\text{gl})$$

$$(t_{\text{exp}} < t_{\text{tabla}})$$

1.4.6. El G_{exp} resultó 0,55; siendo la especificación menor al G_{tabla} que es 0,8709 ($\alpha=0.05, k=3, n=3$).

$$G_{\text{exp}} = 0,85 \quad G_{\text{tabla}} = 0,8709 \quad (\alpha=0,05, k=3, n=3)$$

$$(G_{\text{exp}} < G_{\text{tabla}})$$

1.5. Robustez:

1.5.1. Los coeficientes de variación de los Estándares son conformes $< 2\%$

1.5.2. Los resultados promedios obtenidos de cada experimento fueron:

Experimento	conc. calc. %	Diferencia %
1	6,4671	---
2	6,5213	1,77%
3	6,4689	0,95%
4	6,5506	1,19%
5	6,3900	1,49%

6	6,4027	1,62%
7	6,5118	0,43%
8	6,4254	0,99%

1.5.3. En el cálculo de efectos se determinó que no hay un factor crítico o de mayor influencia ante las variaciones en los parámetros del método

Cálculo de los Efectos:

Factor	Efecto
A	0,06951
B	-0,00648
C	-0,02194
D	0,01072
E	-0,06095
F	-0,01785
G	0,03165

1.5.4. Se considera que el método analítico es robusto puesto que no hay alteraciones significativas en los resultados obtenidos.

1.6. Rango:

1.6.1. Luego de cumplir con los parámetros de precisión, linealidad y exactitud del método, se otorga conformidad a la concentración final de la muestra y estándar, de 0,2 mg/mL equivalente a 200 ppm. El rango de trabajo es de 80% a 120%, es decir concentraciones finales de 160 ppm a 240 ppm.

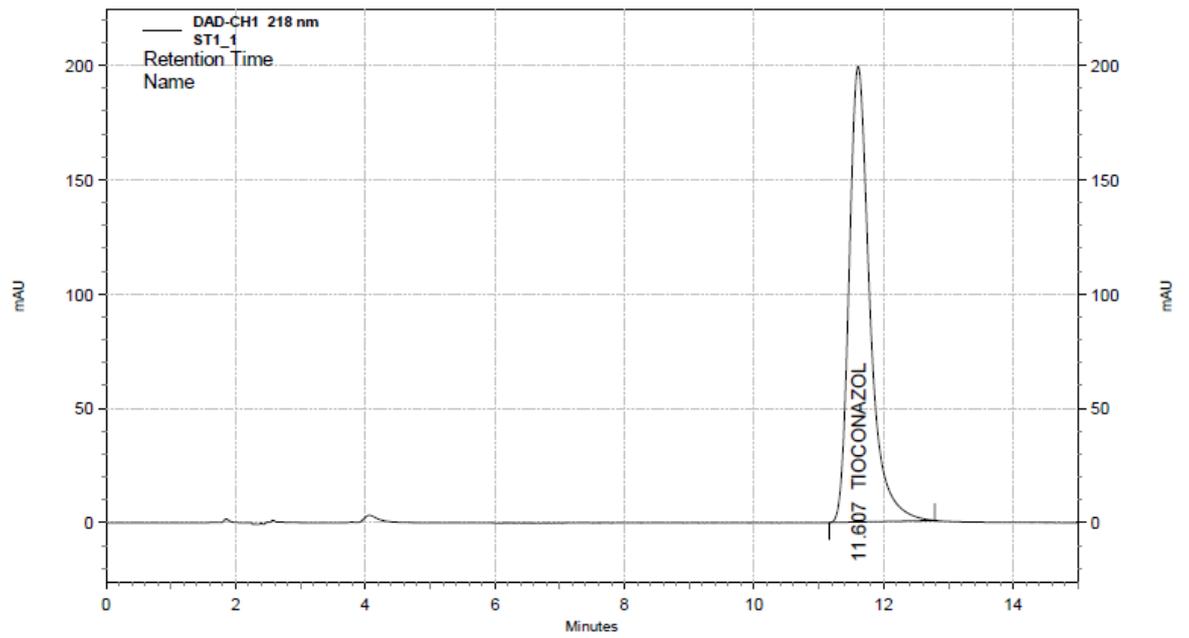


Figura 1: Cromatograma del estándar de tioconazol

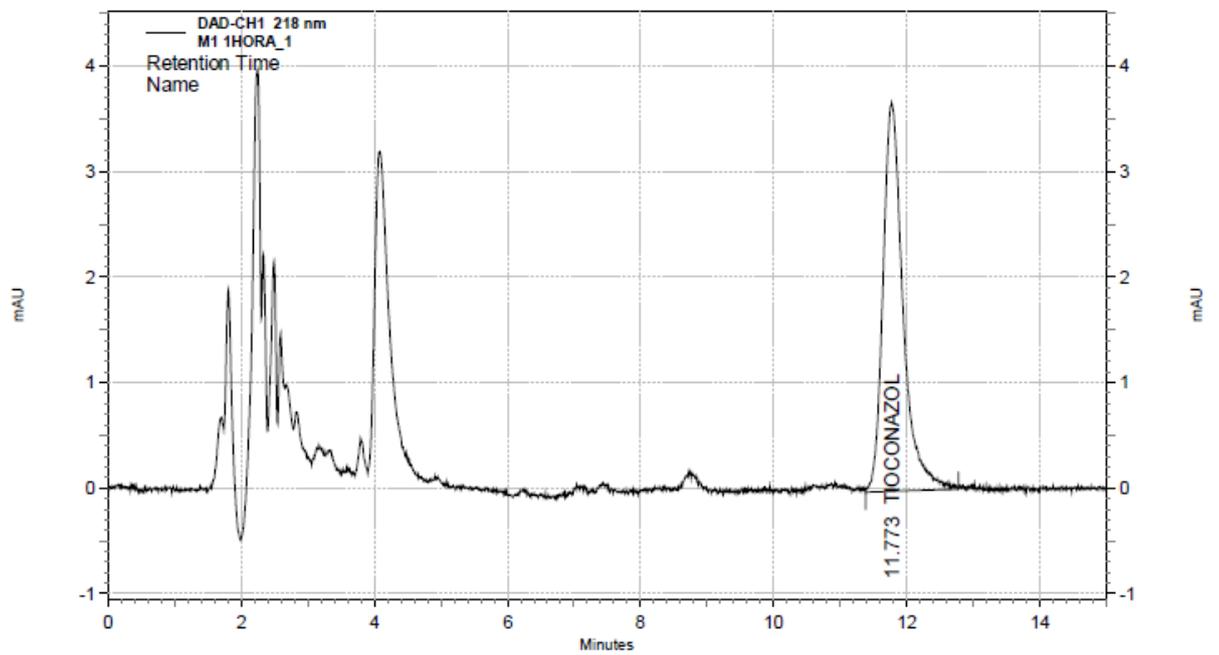


Figura 2: Cromatograma de la muestra de tioconazol

3. Estudios de estabilidad acelerada

Los estudios de estabilidad acelerada que se realizaron demostraron que las tres formulaciones de Tioconazol de 1, 3 y 6,5 % son estables en 6 meses de estabilidad acelerada. Se realizó bajo la normativa NTS N° 182-MINSA/DGEMID-2022, norma técnica de estudios de estabilidad de las especialidades farmacéuticas.

Tabla 11: Estudio de estabilidad acelerada de tioconazol 1% ungüento oftálmico.

Duración: 06 meses

Inicio: 2019-07-26

Fin: 2020-01-26

Temperatura: 40° ± 2°C

Humedad relativa: 75 ± 5 %

Tiempo	Descripción Aspecto*	Identificación de tioconazol**	Cuantificación de Tioconazol (0,9-1,1%)	Esterilidad	Agente antimicrobiano	
					Metilparabeno (0,040-0,060%)	Propilparabeno (0,008-0,012%)
Inicio	Conforme*	Positivo	1,02 %	Estéril	0,043%	0,008%
3 meses	Conforme*	Positivo	1,03%	Estéril	0,043%	0,008%
6 meses	Conforme*	Positivo	0,94 %	Estéril	0,043%	0,008%

*Preparación de consistencia blanda, blanquecina, homogénea

** El tiempo de retención del pico principal en el cromatograma de la preparación de valoración se corresponde con el pico principal en el cromatograma de la preparación estándar según se obtiene en la cuantificación, Técnica propia

Tabla 12: Estudio de estabilidad acelerada de tioconazol 3% ungüento oftálmico.

Duración: 06 meses

Inicio: 2019-07-31

Fin: 2020-01-31

Temperatura: 40° ± 2°C

Humedad relativa: 75 ± 5 %

Tiempo	Descripción Aspecto*	Identificación de tioconazol**	Cuantificación de Tioconazol (2,70-3,30%)	Esterilidad	Agente antimicrobiano	
					Metilparabeno (0,040-0,060%)	Propilparabeno (0,008-0,012%)
Inicio	Conforme*	Positivo	2,93 %	Estéril	0,045%	0,009%
3 meses	Conforme*	Positivo	3,00 %	Estéril	0,045%	0,009%
6 meses	Conforme*	Positivo	2,75 %	Estéril	0,045%	0,009%

*Preparación de consistencia blanda, blanquecina, homogénea

** El tiempo de retención del pico principal en el cromatograma de la preparación de valoración se corresponde con el pico principal en el cromatograma de la preparación estándar según se obtiene en la cuantificación, Técnica propia

Tabla 13: Estudio de estabilidad acelerada de tioconazol 6,5% ungüento oftálmico.

Duración: 06 meses

Inicio: 2019-07-31

Fin: 2020-01-17

Temperatura: $40^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$

Humedad relativa: $75 \pm 5 \%$

Tiempo	Descripción Aspecto*	Identificación de tioconazol**	Cuantificación de Tioconazol (5,85-7,15%)	Esterilidad	Agente antimicrobiano	
					Metilparabeno (0,040-0,060%)	Propilparabeno (0,008-0,012%)
Inicio	Conforme*	Positivo	6,10 %	Estéril	0,040%	0,0089%
3 meses	Conforme*	Positivo	6,04 %	Estéril	0,040%	0,008%
6 meses	Conforme*	Positivo	6,10 %	Estéril	0,040%	0,008%

*Preparación de consistencia blanda, blanquecina, homogénea

** El tiempo de retención del pico principal en el cromatograma de la preparación de valoración se corresponde con el pico principal en el cromatograma de la preparación estándar según se obtiene en la cuantificación, Técnica propia

4. Actividad fúngica del formulado

En el estudio de la actividad antifúngica(43) del tioconazol ungüento oftálmico al 1%, 3% y 6,5%. los resultados demuestran que dichas formulas, en todas las concentraciones evaluadas (1%, 3% y 6,5%) mantienen sus efectos antimicóticos en placa después de haber pasado por el proceso productivo y esterilización en el tanque de fabricación. Se ratifica que, a mayor concentración del activo, mayor efecto inhibitorio sobre *Candida albicans*.

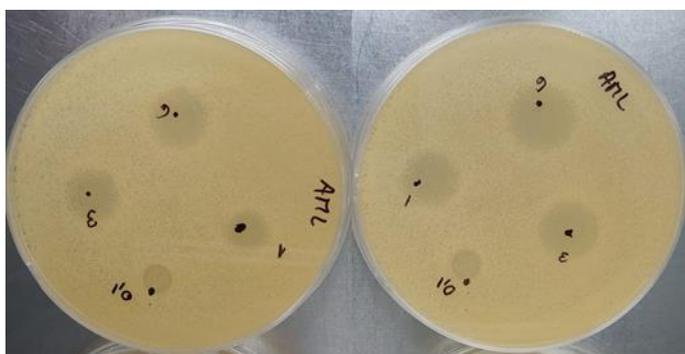


Figura 3: Halos producidos por la inhibición del tioconazol.

Tabla 14: Medidas de halos en milímetros de las concentraciones de tioconazol ungüento oftálmico.

Concentración:	1%	3%	6,5%
	12,23	14,49	16,89
	12,43	13,76	15,56
	12,03	13,83	15,3
	12,07	13,71	15,89
	12,19	13,95	15,91
Promedio:	12,19	13,95	15,91
Desviación Estándar:	0,1575	0,3161	0,6032

5. Irritabilidad ocular in vivo del tioconazol ungüento oftálmico al 1%, 3% y 6,5%,

Tomando como referencia la guía OECD Test 405, se consideran como no irritante ocular, en ninguna de las concentraciones, los resultados evidencian no causan daños, lesiones, síntomas, reacciones sobre la córnea, conjuntiva e iris durante el periodo de observación.

Tabla 15: Score de irritación aguda ocular.

N° de animales	CORNEA							CONJUNTIVA							IRIS							
	1 h*	24 h*	48 h*	72 h*	7 d	14 d	21 d	1 h*	24 h*	48 h*	72 h*	7 d	14 d	21 d	1 h*	24 h*	48 h*	72 h*	7 d	14 d	21 d	
Conejo 1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Conejo 2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Conejo 3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

* Lectura a la 1 h, 24 h, 48 h, 72 h después de aplicar la muestra.

Fuente: Elaboración propia.

6. Eficacia o evaluación biofarmacéutica de las formas de dosificación oftálmica: *In Vitro*

La eficacia en *In Vitro* mediante el método de permeabilidad o difusión de las celdas de Franz (17), se demostró que el tioconazol ungüento oftálmico en sus tres

concentraciones es permeable alcanzando un rango de(%P): 6 -14%, en la córnea de cerdo, lo cual es favorable para el tratamiento de la queratitis fúngica.



Figura 4: Aplicación de tioconazol ungüento oftálmico en las celdas de Franz.

El porcentaje permeado (%P): 6 -14%, flujo en estado estacionario (Jss): 1,14 mg/h y coeficiente de permeación (P): 0,000317455 cm/s.

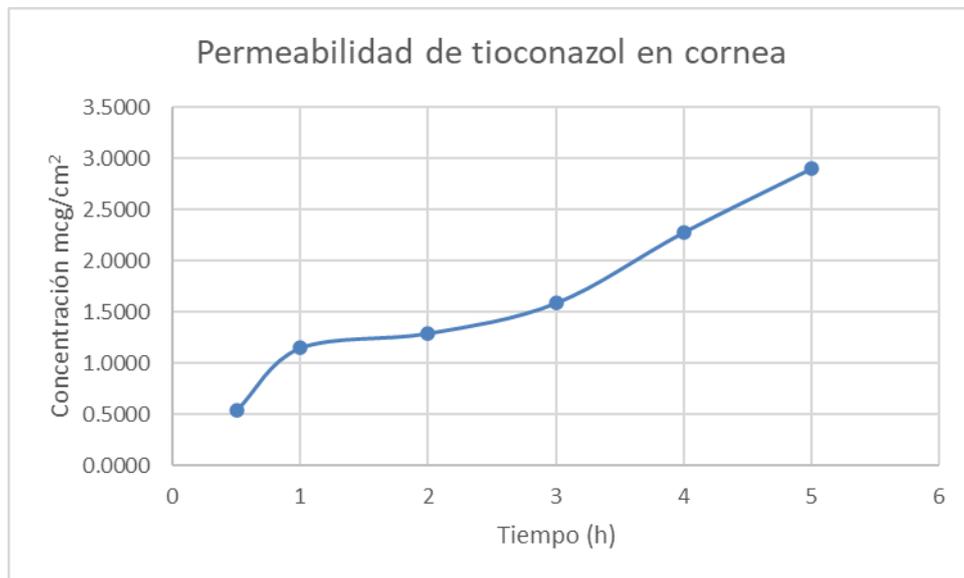


Figura 5: Curva de permeabilidad tioconazol en cornea de cerdo utilizando las celdas de Franz, concentraciones VS tiempo.

Fuente: Elaboración propia

Tabla 16: Datos obtenidos de los ensayos de permeabilidad en las celdas de Franz

TIEMPO (h)	Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3	Promedio	Max	Min	DS
0,5	0,0088	0,5262	1,0736	0,5362	1,0736	0,0088	0,5325
1	0,7555	0,8969	1,7945	1,1490	1,7945	0,7555	0,5635
2	1,1668	0,9012	1,8096	1,2925	1,8096	0,9012	0,4671
3	1,5766	1,0466	2,1375	1,5869	2,1375	1,0466	0,5455
4	2,4182	1,4309	2,9857	2,2783	2,9857	1,4309	0,7868
5	3,0187	1,8249	3,8596	2,9011	3,8596	1,8249	1,0224

Fuente: Elaboración propia

7. Eficacia contra la queratitis fúngica del tioconazol ungüento oftálmico *in vivo*:

El producto tioconazol ungüento oftálmico de 1%, 3% y 6,5%, demuestra eficacia preclínica para el tratamiento de la queratitis fúngica causada por la cepa *Candida albicans* con respecto a placebo o control ($P < 0,05$), después de culminar el tratamiento a los 7 días.

La opacidad corneal se vio disminuida terminando el tratamiento a los 7 días, observándose desde el día 3 esta tendencia, tal como se muestra en la tabla 17.

Tabla 17: Opacidad corneal

Muestra	Días de aplicación / Grado de calificación (\pm DS) 0: Cornea clara, 1: Edema menor, 2: Edema corneal en 2 cuadrantes de la córnea, 3: Edema corneal en más de 3 cuadrantes de la córnea, 4: Opacidad total de la córnea.		
	Día 0	Día 3	Día 7
1 %	2,57 \pm 0,79	2,14 \pm 0,90	1,43 \pm 0,79
3 %	2,71 \pm 0,76	2,00 \pm 0,82	1,29 \pm 0,76
6,5 %	2,57 \pm 0,53	1,71 \pm 0,49	0,57 \pm 0,53
Placebo	2,43 \pm 0,53	2,86 \pm 0,69	3,14 \pm 0,69

Fuente: Elaboración propia.

El nivel de hipopion evidencia mejora a los 7 días de tratamiento, tal como se muestra en la tabla 18.

Tabla 18: Nivel de hipopion

Muestra	Días de aplicación (puntuación en cruces: 0: Ninguno, + : Leve, ++ : Moderado, +++ : Severo)

	Dia 0	Dia 3	Dia 7
1%	+++	+++	++
3%	+++	+++	++
6,5%	+++	++	+
Placebo	+++	++++	++++

Fuente: Elaboración propia.

Figura 6: Ojo inducido a queratitis fúngica con *Candida albicans*.

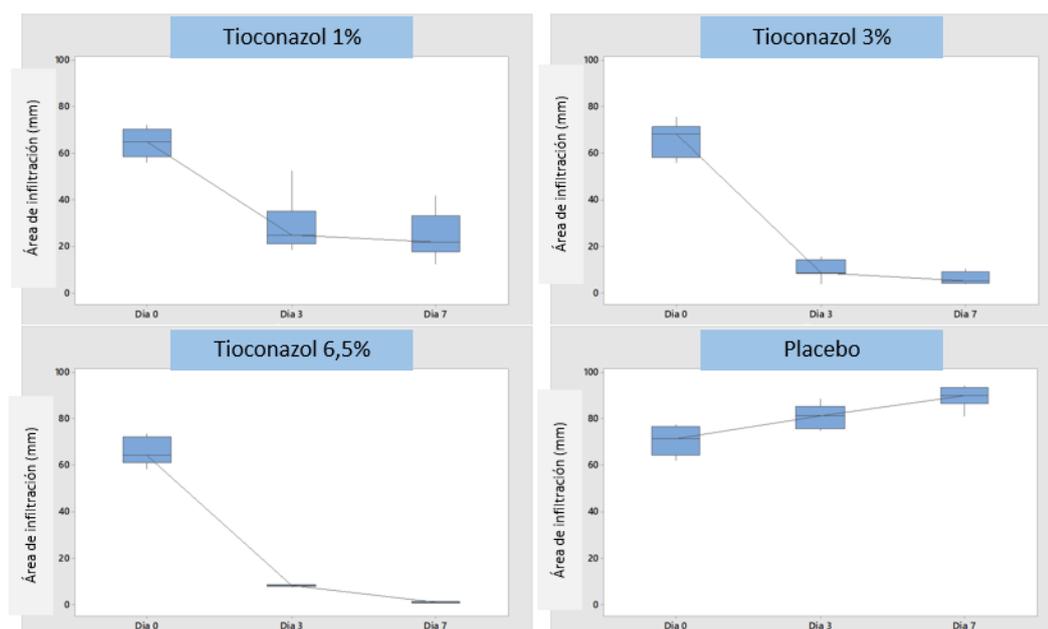
En el análisis del área de infiltración o lesión ocular, se evidencia que existe diferencia significativa entre el placebo y el tratamiento con Tioconazol al 1%, 3% y 6,5 % al día 7 ($P < 0,05$), Así mismo no existe diferencia significativa entre la concentración de Tioconazol de 3% y 6.5% ($P > 0,05$), tal como se muestran en la tabla 19 y figura 7.

Tabla 19: Área de lesión o infiltración ocular y el tratamiento con tioconazol.

Muestra Tioconazol	Día de aplicación / Área (mm) (\pm DS)		
	Dia 0	Dia 3	Dia 7
1%	64,32 \pm 6,03	29,86 \pm 11.76	24,77 \pm 10,02
3%	66,04 \pm 7,09	9,87 \pm 4.09	6,24 \pm 2,56
6,5%	66,16 \pm 5,97	8,28 \pm 0.46	1,11 \pm 0,36
Placebo	70,31 \pm 5,80	81,22 \pm 5.24	89,49 \pm 4,70

Fuente: Elaboración propia.

Figura 7: Área de infiltración desde día cero al siete.



Fuente: Elaboración propia.

Tabla 20: Porcentaje de reducción de la lesión de las fórmulas:

Tioconazol	Día 0	Día 3	Día 7	Diferencia en (mm) entre día 0 y 7	% Reducción de la Lesión
1%	64,32	29,86	24,77	39,55	61%
3%	66,04	9,87	6,24	59,8	91%
6,50%	66,16	8,28	1,11	65,05	98%

Fuente: Elaboración propia.

Tabla 21: Porcentaje de aumento de la lesión del placebo:

	Día 0	Día 3	Día 7	Diferencia entre día 0 y 7	% Aumento de la lesión
Placebo	70,31	81,22	89,49	19,18	27%

Fuente: Elaboración propia.

Evaluación histológica de las células corneales

Los resultados muestran que los epitelios corneales tratados con tioconazol 1, 3 y 6,5% ungüento oftálmico, No presentan células inflamatorias, existen leves zonas con edema en estroma, a diferencia del epitelio corneal tratado con placebo, estos

si presentan zonas con edema, incremento moderado de capilares sanguíneos y abundantes células inflamatorias en estroma, tal como se indican en los resultados:

Tabla 22: Histología de ojos con tratamiento Muestra 1 %.

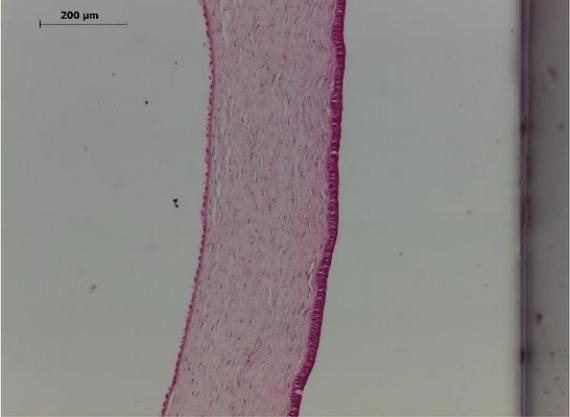
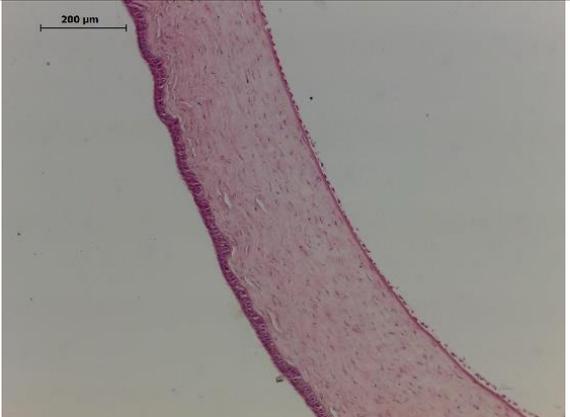
<p>OJO IZQUIERDO: Epitelio corneal con moderada disminución de capa escamosa. Leves zonas de edema en estroma. Leve aumento de capilares sanguíneos. Leve incremento de células inflamatorias.</p>	
<p>OJO DERECHO (Control): Epitelio corneal sin alteraciones. Estroma de aspecto normal. No se observan células inflamatorias.</p>	

Tabla 23: Histología de ojos con tratamiento Muestra 3 %.

<p>OJO IZQUIERDO:</p> <p>Epitelio corneal con leve disminución de capa escamosa. Leves zonas de edema en estroma. No se observan células inflamatorias.</p>	 <p>200 μm</p>
<p>OJO DERECHO (Control):</p> <p>Epitelio corneal sin alteraciones. Estroma de aspecto normal. No se observan células inflamatorias.</p>	 <p>200 μm</p>

Tabla 24: Histología de ojos con tratamiento Muestra 6,5 %.

<p>OJO IZQUIERDO:</p> <p>Epitelio corneal con leve disminución de capa escamosa. Estroma de aspecto normal. No se observan células inflamatorias.</p>	 <p>200 μm</p>
--	--

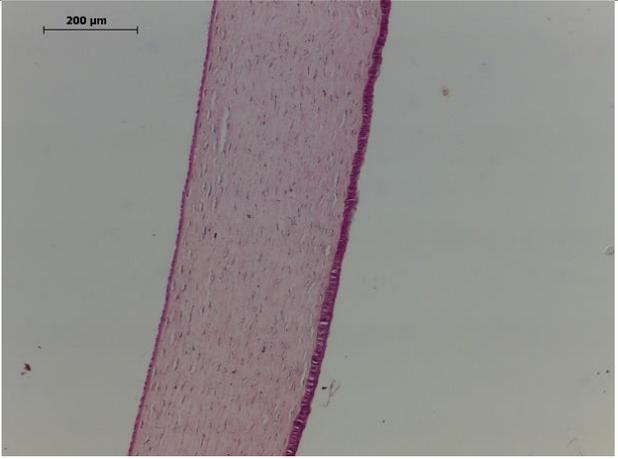
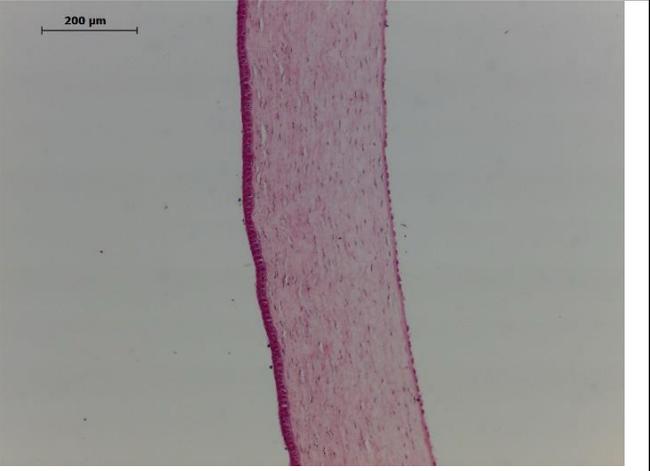
<p>OJO DERECHO (Control): Epitelio corneal sin alteraciones. Estroma de aspecto normal. No se observan células inflamatorias.</p>	
---	--

Tabla 25: Histología de ojos con tratamiento placebo.

<p>OJO IZQUIERDO: Epitelio corneal con severa disminución de capa escamosa. Zonas con edema en estroma. Incremento moderado de capilares sanguíneos. Abundantes células inflamatorias en estroma.</p>	
<p>OJO DERECHO (Control): Epitelio corneal sin alteraciones. Estroma de aspecto normal. No se observan células inflamatorias.</p>	

VII. DISCUSION

Con respecto al objetivo de la formulación del tioconazol ungüento oftálmico al 1%, 3% y 6,5%, esta se realizó utilizando bases oleosas tales como petrolato blanco y aceite mineral que permitan la aplicación oftálmica y a su vez se utilizó conservadores ampliamente conocidos como el metilparabeno y propilparabeno que otorga buenos resultados, en cuanto al proceso de fabricación siguió todos los lineamientos de las Buenas Prácticas de Manufactura las cuales asegura que el producto farmacéutico cumpla con todas las pruebas de calidad respectiva tal como se indica en la tabla 4. Los resultados en cuanto a aspecto, identificación, cuantificación del tioconazol, cuantificaciones de los conservantes y la prueba de esterilidad están conformes dentro de las especificaciones respectivas. En investigación realizada por Dávila quien desarrollo una pomada oftálmica de tacrolimus para el tratamiento de úlceras corneales inmunológica (44) se evidencia que en dicho desarrollo utilizan también el aceite mineral o vaselina liquida como excipiente, no obstante su caducidad asignada solo fue de 1 mes por no contener preservantes en su fórmula magistral.

Todo producto farmacéutico debe contar con estudios de estudios de estabilidad en condiciones aceleradas para evidenciar que con el paso del tiempo no sufre cambios que puedan afectar su seguridad y eficacia, en ese sentido, las formulaciones de tioconazol ungüento oftálmico de 1%, 3% y 6,5% han demostrado estabilidad en condiciones aceleradas por 6 meses tal como se indica en la tablas 5, 6 y 7. Esto nos indica que dichas formulaciones cumplen un parámetro importante que necesita toda forma farmacéutica. Comparando con la investigación de Gaspar titulada: recomendaciones de conservación y período de validez de los envases multidosis tras su apertura (21) vemos que las fórmulas desarrolladas de tioconazol, también

cumplen con dicho atributo que es de vital importancia en fármacos multidosis así evitar correr riesgo de dañarse y perder la efectividad del medicamento.

El tioconazol es un antifúngico sintético del grupo del imidazol que muestra “in vitro”, un amplio espectro de actividad frente a dermatofitos (*Trichophyton* sp, *Microsporum* sp, *Epidermophyton floccosum*), levaduras (*Candida albicans* y sp) hongos levuliformes y *Pityrosporum orbiculare*, presentando asimismo actividad frente a algunos gérmenes grampositivos, no obstante la actividad antifúngica del tioconazol como ungüento oftálmico al 1%, 3% y 6,5% podría verse afectada por la misma formulación (interacción de los excipientes) y/o proceso de fabricación, por esta razón uno de los objetivos de la presente investigación es determinar su actividad antifúngica como producto terminado frente a *Candida albicans*. Las pruebas confirman que las formulaciones inhiben el crecimiento de dicha cepa. Por lo cual se demuestra que los excipientes de la formula y el mismo proceso de fabricación no altera las propiedades antifúngicas del tioconazol ungüento oftálmico en sus 3 concentraciones. Comparando los resultados de las tres concentraciones: 1%, 3% y 6,5% de tioconazol, se evidencia que la de 6,5% tiene mejor efecto de inhibición de crecimiento de la cepa *Candida albicans*.

Los medicamentos de uso oftálmico no deben producir alguna irritabilidad ocular, daño o lesión en dicho órgano, en el presente estudio los ensayos demuestran que las formulaciones de tioconazol 1%, 3% y 6,5% ungüento oftálmico no causan ninguna irritabilidad ocular según muestra la tabla 9. Donde se evidencia que no produjeron daños, ni lesiones, ni síntomas, ni reacciones sobre la córnea, conjuntiva e iris durante el período de observación. Comparado con la investigación de Dutescu (45) donde muestra los efectos de diferentes productos oftálmicos y hasta

un preservante en la córnea del conejo, vemos que las fórmulas de tioconazol desarrolladas no causar algún daño, lesión o irritabilidad ocular.

Con el objetivo de demostrar la eficacia contra la queratitis fúngica del tioconazol ungüento oftálmico in vitro e in vivo, los resultados evidencian que hay una reducción de hasta el 98% de la lesión que fue inducida por un inóculo de *Candida albicans* en el estroma de la córnea del conejo, donde el tratamiento fue por 7 días, La concentración de tioconazol 6,5% ungüento oftálmico, tiene mejor eficacia que las otras concentraciones, por lo tanto, se demuestra la eficacia del tioconazol 1%, 3% y 6,5% ungüento oftálmico para el tratamiento de la queratitis fúngica causada por hongos del género *Candida albicans*. Comparando los resultados con una formulación en forma de película mucoadhesiva vaginal para la candidiasis vaginal el resultado demuestra una fuerte actividad antifúngica frente a la *Candida albicans* in vitro (46), vemos que el tioconazol en forma de ungüento oftálmico también tiene eficacia contra la queratitis fúngica causada por la dicha cepa a nivel ocular.

Si bien es cierto, el uso de ratas para este tipo de experimentación es más común por ser adecuado debido a las ventajas que brinda sus corneas, no obstante, los conejos también se utilizan para investigación ocular debido a su gran superficie ocular (a pesar de ser clasificado como un pequeño animal de experimentación), facilidad de reproducción y facilidad de manejo. Similar a las ratas, los conejos también están menos desarrollados genéticamente que los ratones. Técnicas de inoculación, como la inyección intraestromal en la córnea, se puede utilizar en conejos, así como en varios regímenes inmunosupresores. Por ejemplo, García et al. utilizó conejos para determinar la Eficacia de aglutinina de germen de trigo-peroxidasa como colorante para la detección de lectinas fúngicas en las corneas infectados con *Candida. albicans*, *A. fumigatus* o *F. solani*. Ghosh et al. También

utilizo el modelo de conejo de queratitis fúngica para determinar que la administración liposomal de anfotericina B la cual no aumentó la actividad antifúngica en comparación con una preparación de fármaco estándar (20).

En estudio titulado: caspofungina tópica para el tratamiento de la queratitis causada por *Candida albicans* en un modelo de conejo, en la cual compararon la eficacia de la caspofungina tópica con la de la anfotericina B tópica, los resultados fueron similares al presente estudio, El tratamiento farmacológico redujo significativamente la recuperación de hongos en la córnea de 3,78 log₁₀ UFC en pacientes tratados con solución salina, animales a 2,97, 1,76 y 1,18 log₁₀ UFC en animales tratados con 0,15 % de caspofungina, 0,5 % de caspofungina y 0,15% anfotericina B, respectivamente. El estudio también se hizo en modelo de conejo donde la caspofungina al 0,5 % fue tan eficaz como la anfotericina B al 0,15 %. para el tratamiento tópico de la queratitis por *candida*. Cabe precisar que la eficacia clínica potencial de la caspofungina aún está pendiente investigación según refieren los autores (47).

El artículo científico titulado: “Influencia de los métodos de liberación in vitro en la evaluación de tobramicina ungüento oftálmico” (48), se indica que el contenido de su principio activo en sus fórmulas desarrolladas, tiene una desviación estándar relativa de hasta 6,11% en su fórmula: F3. Las formulaciones de tioconazol ungüento oftálmico desarrolladas en el presente estudio, tienen una desviación estándar relativa: tioconazol 1% es 4,95%, tioconazol 3% es 4,46% y tioconazol 6,5% es de 0,57%, con lo cual podemos comparar que la dispersión de nuestro principio activo sobre los excipientes en los resultados de estudio de estabilidad acelerada, es adecuada para una fórmula de un ungüento oftálmico.

VIII. CONCLUSIONES

1. Se desarrolló las fórmulas del tioconazol ungüento oftálmico a 1%, 3% y 6,5%.
2. Se demostró que las fórmulas de tioconazol a diferentes concentraciones cumplen las especificaciones de calidad establecidas y de estabilidad acelerada de 6 meses.
3. Se demostró que las fórmulas de tioconazol ungüento oftálmico mantuvo su actividad antimicótica durante el proceso productivo puesto que inhibió el crecimiento de la especie *Candida albicans in vitro* formando halos de hasta 15,91 mm.
4. Las fórmulas del tioconazol ungüento oftálmico a 1%, 3% y 6,5% no causa ninguna irritación ocular ni efecto adverso.
5. El tioconazol ungüento oftálmico es permeable hasta un 14% en la córnea del modelo animal.
6. El tioconazol ungüento oftálmico demostró ser eficaz preclínicamente para el tratamiento de la queratitis fúngica en conejos causada por la especie *Candida albicans*, donde la concentración de 1%, 3% y 6,5 % redujo la lesión en 61%, 91% y 98% respectivamente.

IX. RECOMENDACIONES

1. Evaluar las formulaciones de tioconazol con otras cepas de hongos como *Aspergillus brasilienses*, entre otras cepas que causan la queratitis fúngica en humanos.
2. Realizar los estudios clínicos en humanos para demostrar la eficacia del tioconazol ungüento oftálmico 3%.
3. Realizar análisis de costos del tioconazol ungüento oftálmico en tamaños de lote industriales comparando con otras moléculas que ya están en el mercado que también se utilizan para el tratamiento de la queratitis fúngica.
4. Realizar estudios de permeabilidad de otras moléculas oftálmicas con la metodología es practicada en este proyecto de investigación.
5. Realizar la validación del proceso de manufactura con 3 lotes de tamaño industrial para verificar la idoneidad del proceso y evaluar la dispersión del principio activo.
6. Realizar los estudios de estabilidad a largo plazo.
7. Desarrollar la metodología analítica para determinar las impurezas de la fórmula.
8. Evaluar la conveniencia de que la fórmula lleve preservantes o realizar la prueba de desafío microbiano a la fórmula para confirmar el efecto de los preservantes.

X. BIBLIOGRAFIA

1. Brasnu E, Bourcier T, Dupas B, Degorge S, Rodallec T, Laroche L, et al. In vivo confocal microscopy in fungal keratitis. *British Journal of Ophthalmology*. 1 de mayo de 2007;91(5):588-91.
2. Buscador de Precios de Medicamentos [Internet]. [citado 18 de octubre de 2018]. Disponible en: http://observatorio.digemid.minsa.gob.pe/Precios/ProcesoL/Consulta/BusquedaGral.aspx?grupo=2740*3&total=1*1&con=5* @&ffs=24&ubigeo=15&cad=NATAMICINA*5* @*Solucion*-*Suspension.
3. ER.-Retos-y-oportunidades-LIBRO.pdf.
4. Benedí J, Martín-Aragón S. Tratamiento de las infecciones ginecológicas. *Revisión. Farmacia Profesional*. 1 de enero de 2009;23(1):52-7.
5. Mesias Costilla L, Espinoza Carrillo R, Rojas Castillo K, Quispe Ramirez A, Torres Mariñas D. Ulceras Micóticas: Tratamiento con Tioconazol. *Monitor Medico*. julio de 2021;55:24.
6. Herreros JMA. Preparación de medicamentos y formulación magistral para oftalmología. Ediciones Díaz de Santos; 2003. 164 p.
7. Lisart FF. ELABORACIÓN DE MEDICAMENTOS: ESTÉRILES (SALAS BLANCAS) Y NO ESTÉRILES. ELABORACIÓN DE MEDICAMENTOS PELIGROSOS.
8. Posarelli C, Passani A, Del Re M, Fogli S, Toro MD, Ferreras A, et al. Cross-Linked Hyaluronic Acid as Tear Film Substitute. *J Ocul Pharmacol Ther*. septiembre de 2019;35(7):381-7.
9. Tema_15.-_Preparados_para_uso_ofthalmico.pdf [Internet]. [citado 2 de junio de 2024]. Disponible en: https://ocw.ehu.es/pluginfile.php/47653/mod_resource/content/1/10122015_materiales_de_estudio/Tema_15.-_Preparados_para_uso_ofthalmico.pdf
10. Andrés-Guerrero V, Herrero-Vanrell R. Absorción de fármacos por vía tópica: Papel de la conjuntiva. *Archivos de la Sociedad Española de Oftalmología*. diciembre de 2008;83(12):683-5.
11. Kaviarasi B, Rajana N, Pooja YS, Rajalakshmi AN, Singh SB, Mehra NK. Investigating the effectiveness of Difluprednate-Loaded core-shell lipid-polymeric hybrid nanoparticles for ocular delivery. *Int J Pharm*. 10 de junio de 2023;640:123006.
12. Srinivasan S, Williams R. Propylene Glycol and Hydroxypropyl Guar Nanoemulsion - Safe and Effective Lubricant Eye Drops in the Management of Dry Eye Disease. *Clin Ophthalmol*. 10 de octubre de 2022;16:3311-26.

13. Bao Q, Burgess DJ. Perspectives on Physicochemical and In Vitro Profiling of Ophthalmic Ointments. *Pharm Res.* 15 de octubre de 2018;35(12):234.
14. Hoy SM. Ciclosporin Ophthalmic Emulsion 0.1%: A Review in Severe Dry Eye Disease. *Drugs.* noviembre de 2017;77(17):1909-16.
15. Sathe P, Kailasam V, Nagarjuna V, Sharma H, Velpandian T, Garg P, et al. Nanomicelles empower natamycin in treating fungal keratitis: An in vitro, ex vivo and in vivo study. *International Journal of Pharmaceutics.* mayo de 2024;656:124118.
16. Zhang X, Xing H, Zhao Y, Ma Z. Pharmaceutical Dispersion Techniques for Dissolution and Bioavailability Enhancement of Poorly Water-Soluble Drugs. *Pharmaceutics.* 23 de junio de 2018;10(3):74.
17. Bao Q, Newman B, Wang Y, Choi S, Burgess DJ. In vitro and ex vivo correlation of drug release from ophthalmic ointments. *Journal of Controlled Release.* abril de 2018;276:93-101.
18. Hamida Abdelkader SM, Rodríguez Calvo-de-Mora M, Gegúndez-Fernández JA, Soler-Ferrández FL, Rocha-de-Lossada C. Revisión de la literatura sobre la evidencia disponible actualmente para el manejo de las queratitis infecciosas con PACK-CXL. *Archivos de la Sociedad Española de Oftalmología.* agosto de 2022;97(8):464-72.
19. Prieto C. Oftalmólogos Martínez de Carneros Madrid. 2022 [citado 2 de junio de 2024]. CAUSAS, SÍNTOMAS Y TRATAMIENTO DE LA QUERATITIS » Oftalmólogos Martínez de Carneros Madrid. Disponible en: <https://www.martinezdecarneros.com/causas-sintomas-y-tratamiento-de-la-queratitis/>
20. Brown L, Leck AK, Gichangi M, Burton MJ, Denning DW. The global incidence and diagnosis of fungal keratitis. *The Lancet Infectious Diseases.* 1 de marzo de 2021;21(3):e49-57.
21. Khurana S, Agrawal SK, Megha K, Dwivedi S, Jain N, Gupta A. Demographic and clinical profile of microspodial keratitis in North India: an underreported entity. *J Parasit Dis.* diciembre de 2019;43(4):601-6.
22. Thomas PA, Kaliamurthy J. Mycotic keratitis: epidemiology, diagnosis and management. *Clin Microbiol Infect.* marzo de 2013;19(3):210-20.
23. Elsayed EA, Farid MA, El-Enshasy HA. Enhanced Natamycin production by *Streptomyces natalensis* in shake-flasks and stirred tank bioreactor under batch and fed-batch conditions. *BMC Biotechnol.* 16 de julio de 2019;19:46.
24. Rohilla R, Meena S, Mohanty A, Gupta N, Kaistha N, Gupta P, et al. Etiological spectrum of infectious keratitis in the era of MALDI-TOF-MS at a tertiary care hospital. *J Family Med Prim Care.* 30 de septiembre de 2020;9(9):4576-81.

25. Berkow EL, Lockhart SR, Ostrosky-Zeichner L. Antifungal Susceptibility Testing: Current Approaches. *Clin Microbiol Rev.* 17 de junio de 2020;33(3):e00069-19.
26. Kepez Yildiz B, Hasanreisoglu M, Aktas Z, Aksu G, Kocak BC, Akata F. Fungal keratitis secondary to *Scedosporium apiospermum* infection and successful treatment with surgical and medical intervention. *Int Ophthalmol.* abril de 2014;34(2):305-8.
27. Brooks S. Comparing Two Means - Sample Size [Internet]. Select Statistical Consultants. [citado 2 de junio de 2024]. Disponible en: <https://select-statistics.co.uk/calculators/sample-size-calculator-two-means/>
28. Ghosh AK, Rudramurthy SM, Gupta A, Choudhary H, Singh S, Thakur A, et al. Evaluation of Liposomal and Conventional Amphotericin B in Experimental Fungal Keratitis Rabbit Model. *Trans Vis Sci Tech.* 6 de junio de 2019;8(3):35.
29. Kalkanci A, Ozdek S. Ocular Fungal Infections. *Current Eye Research.* marzo de 2011;36(3):179-89.
30. Fuentes Paredes F de M, Mendoza Yanavilca RA, Rivera Rodríguez R, Vara Márquez MD, Instituto Nacional de Salud (Peru). Guía de manejo y cuidado de animales de laboratorio: conejo. Lima: Ministerio de Salud, Instituto Nacional de Salud; 2010.
31. Bhagurkar AM, Angamuthu M, Patil H, Tiwari RV, Maurya A, Hashemnejad SM, et al. Development of an Ointment Formulation Using Hot-Melt Extrusion Technology. *AAPS PharmSciTech.* 1 de febrero de 2016;17(1):158-66.
32. Peck R. Ophthalmic Formulation Development [Internet]. VxP Pharma. 2018 [citado 26 de octubre de 2018]. Disponible en: <https://www.vxppharma.com/ophthalmic-formulation-development/>
33. (771) PRODUCTOS OFTÁLMICOS-PRUEBAS DE CALIDAD. En: *Farmacopea de los Estados Unidos 2018.* p. 6949-55.
34. ResearchGate [Internet]. [citado 26 de octubre de 2018]. FORMULATION OF KETOCONAZOLE OPHTHALMIC OINTMENT USING COW GHEE AS A BASE AND PENETRATION ENHANCER | Request PDF. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/306521799_FORMULATION_OF_KETOCONAZOLE_OPHTHALMIC_OINTMENT_USING_COW_GHEE_AS_A_BASE_AND_PENETRATION_ENHANCER
35. Mohanty B, Mishra SK, Majumdar DK. Effect of formulation factors on in vitro transcorneal permeation of voriconazole from aqueous drops. *J Adv Pharm Technol Res.* 2013;4(4):210-6.
36. Taylor & Francis [Internet]. [citado 29 de octubre de 2018]. Acute Toxicity and Eye Irritancy | Hayes' Principles and Methods of Toxicology | Taylor & Francis Group. Disponible en: <https://www.taylorfrancis.com/>

37. Palma GC. ESTUDIOS DE PERMEACIÓN DE ACETAZOLAMIDA DESDE UNA FORMULACIÓN LÍQUIDA DE ADMINISTRACIÓN OFTÁLMICA. :46.
38. Dave V, Paliwal S, Yadav S, Sharma S. Effect of In Vitro Transcorneal Approach of Aceclofenac Eye Drops through Excised Goat, Sheep, and Buffalo Corneas. ScientificWorldJournal [Internet]. 2015 [citado 31 de octubre de 2018];2015. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4310252/>
39. Oliveira LAD, Takata TT, Shiguematsu AI, Melo Júnior LAS, Gompertz OF, Sousa LBD, et al. Effect of topical 0.5% povidone-iodine compared to 5% natamycin in fungal keratitis caused by *Fusarium solani* in a rabbit model: a pilot study. Arq Bras Oftalmol. diciembre de 2008;71(6):860-4.
40. Galperin G. Tratamiento de queratitis micótica por *Fusarium* con crosslinking corneal [Internet]. Javier Casiraghi; [citado 10 de enero de 2019]. Disponible en: <https://www.ofthalmologos.org.ar/oce/items/show/263>
41. Carbone L. Chapter 11 - Euthanasia and Laboratory Animal Welfare. En: Bayne K, Turner PV, editores. Laboratory Animal Welfare [Internet]. Boston: Academic Press; 2014 [citado 15 de enero de 2019]. p. 157-69. (American College of Laboratory Animal Medicine). Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123851031000117>
42. Jaiswal M, Kumar M, Pathak K. Zero order delivery of itraconazole via polymeric micelles incorporated in situ ocular gel for the management of fungal keratitis. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. 1 de junio de 2015;130:23-30.
43. Li Z, Liu M, Dawuti G, Dou Q, Ma Y, Liu H, et al. Antifungal Activity of Gallic Acid *In Vitro* and *In Vivo*. Phytotherapy Research. julio de 2017;31(7):1039-45.
44. Dávila-Fajardo CL, Cabeza Barrera J, Vallejo Rodríguez I, García Serrano JL. Pomada oftálmica de tacrolimus para el tratamiento de úlceras corneales inmunológicas. Farmacia Hospitalaria. abril de 2009;33(2):112-3.
45. Dutescu RM, Panfil C, Schrage N. Comparison of the effects of various lubricant eye drops on the in vitro rabbit corneal healing and toxicity. Experimental and Toxicologic Pathology. marzo de 2017;69(3):123-9.
46. Calvo NL, Svetaz LA, Alvarez VA, Quiroga AD, Lamas MC, Leonardi D. Chitosan-hydroxypropyl methylcellulose tioconazole films: A promising alternative dosage form for the treatment of vaginal candidiasis. International Journal of Pharmaceutics. 10 de febrero de 2019;556:181-91.
47. Goldblum D, Frueh BE, Sarra GM, Katsoulis K, Zimmerli S. Topical Caspofungin for Treatment of Keratitis Caused by *Candida albicans* in a Rabbit Model. Antimicrob Agents Chemother. abril de 2005;49(4):1359-63.

48. Patere S, Newman B, Wang Y, Choi S, Mekjaruskul C, Jay M, et al. Influence of in vitro release methods on assessment of tobramycin ophthalmic ointments. *International Journal of Pharmaceutics*. noviembre de 2020;590:119938.

XI. ANEXOS

Anexo 1: Reporte de Análisis de las Fórmulas de Tioconazol 1%, 3% y 6,5% ungüento oftálmico, Inicio.

Producto : TIOCONAZOL 1% Ungüento Oftálmico
 Lote : 10719
 Tipo de Estabilidad : NORMAL
 Fecha de Análisis : 2019-07-26
 Tiempo de Muestreo : INICIO

Pruebas Efectuadas	Resultados	Especificaciones
Aspecto:	Preparación de consistencia blanda, blanquecina, homogénea.	Preparación de consistencia blanda, blanquecina, homogénea.
Identificación	El tiempo de retención del pico principal en el cromatograma de la preparación de valoración se corresponde con el pico principal en el cromatograma de la preparación estándar según se obtiene en la cuantificación.	El tiempo de retención del pico principal en el cromatograma de la preparación de valoración se corresponde con el pico principal en el cromatograma de la preparación estándar según se obtiene en la cuantificación.
Cuantificación de Tioconazol	1,02 % 102,0 %	0,9 – 1,1 % 90,0 – 110,0 %
Cuantificación de Metilparabeno	0,043 g/100g 86,0%	0,040 – 0,060 % 80,0 – 120,0%
Cuantificación de Propilparabeno	0,008 g/100g 80,0%	0,008 – 0,012 % 80,0 – 120,0%
Esterilidad	Estéril	Estéril

Resultados: CONFORME

Observaciones:

.....

.....



Realizado por



Jefe de Control de Calidad

Producto : TIOCONAZOL 3% Ungüento Oftálmico
 Lote : 10729
 Tipo de Estabilidad : NORMAL
 Fecha de Análisis : 2019-07-31
 Tiempo de Muestreo : INICIO

Pruebas Efectuadas	Resultados	Especificaciones
Aspecto:	Preparación de consistencia blanda, blanquecina, homogénea.	Preparación de consistencia blanda, blanquecina, homogénea.
Identificación	El tiempo de retención del pico principal en el cromatograma de la preparación de valoración se corresponde con el pico principal en el cromatograma de la preparación estándar según se obtiene en la cuantificación.	El tiempo de retención del pico principal en el cromatograma de la preparación de valoración se corresponde con el pico principal en el cromatograma de la preparación estándar según se obtiene en la cuantificación.
Cuantificación de Tioconazol	2,93 % 97,6 %	2,70 – 3,30 % 90,0 – 110,0 %
Cuantificación de Metilparabeno	0,045 g/100g 90,0%	0,040 – 0,060 % 80,0 – 120,0%
Cuantificación de Propilparabeno	0,009 g/100g 90,0%	0,008 – 0,012 % 80,0 – 120,0%
Esterilidad	Estéril	Estéril

Resultados: CONFORME

Observaciones:

.....



Realizado por



Jefe de Control de Calidad

Producto : TIOCONAZOL 6,5% Ungüento Oftálmico
 Lote : 10739
 Tipo de Estabilidad : NORMAL
 Fecha de Análisis : 2019-08-02
 Tiempo de Muestreo : INICIO

Pruebas Efectuadas	Resultados	Especificaciones
Aspecto:	Preparación de consistencia blanda, blanquecina, homogénea.	Preparación de consistencia blanda, blanquecina, homogénea.
Identificación	El tiempo de retención del pico principal en el cromatograma de la preparación de valoración se corresponde con el pico principal en el cromatograma de la preparación estándar según se obtiene en la cuantificación.	El tiempo de retención del pico principal en el cromatograma de la preparación de valoración se corresponde con el pico principal en el cromatograma de la preparación estándar según se obtiene en la cuantificación.
Cuantificación de Tioconazol	6,91 % 106,3 %	5,85 – 7,15 % 90,0 – 110,0 %
Cuantificación de Metilparabeno	0,040 g/100g 80,0%	0,040 – 0,060 % 80,0 – 120,0%
Cuantificación de Propilparabeno	0,008 g/100g 80,0%	0,008 – 0,012 % 80,0 – 120,0%
Esterilidad	Estéril	Estéril

Resultados: CONFORME

Observaciones:

.....



Realizado por



Jefe de Control de Calidad

Anexo 2: Reporte de Estudios de Estabilidad Acelerada de las Fórmulas de Tioconazol 1%, 3% y 6.5% ungüento oftálmico.

FABRICANTE : LABORATORIOS LANSIER S.A.C.

PRODUCTO : TIOCONAZOL 1% Ungüento Oftálmico

LOTE : 10719

TAMAÑO DE LOTE : 2 kilos

TIPO DE LOTE : Piloto

FABRICADO : 2019-07-16

VENCIMIENTO : Por Determinar

MATERIA PRIMA : Tioconazol lote Y21501129

ENVASE : Tubo blanco colapsible laminado de polietileno de baja densidad/aluminio/polietileno de baja densidad

TIEMPO DE VIDA UTIL : Por Determinar

METODOLOGÍA : Técnica Propia

RESULTADOS DE LAS PRUEBAS DE ESTABILIDAD ACELERADA

Duración: 06 meses

Inicio: 2019-07-26

Fin: 2020-01-26

Temperatura: 40° ± 2°C

Humedad relativa: 75 ± 5 %

Tiempo	Descripción Aspecto*	Identificación de tioconazol**	Cuantificación de Tioconazol (0,9-1,1%)	Esterilidad	Agente antimicrobiano	
					Metilparabeno (0,040-0,060%)	Propilparabeno (0,008-0,012%)
Inicio	Conforme*	Positivo	1,02 %	Estéril	0,043%	0,008%
3 meses	Conforme*	Positivo	1,03%	Estéril	0,043%	0,008%
6 meses	Conforme*	Positivo	0,94 %	Estéril	0,043%	0,008%

*Preparación de consistencia blanda, blanquecina, homogénea

** El tiempo de retención del pico principal corresponde con el pico principal DEL estándar según se obtiene en la cuantificación.



Responsable



Jefe de Control de Calidad

FABRICANTE : LABORATORIOS LANSIER S.A.C.

PRODUCTO : TIOCONAZOL 3% Ungüento Oftálmico

LOTE : 10729

TAMAÑO DE LOTE : 2 kilos

TIPO DE LOTE : Piloto

FABRICADO : 2019-07-16

VENCIMIENTO : Por Determinar

MATERIA PRIMA : Tioconazol lote Y21501129

ENVASE : Tubo blanco colapsible laminado de polietileno de baja densidad/aluminio/polietileno de baja densidad

TIEMPO DE VIDA UTIL : Por Determinar

METODOLOGÍA : Técnica Propia

RESULTADOS DE LAS PRUEBAS DE ESTABILIDAD ACELERADA

Duración: 06 meses

Inicio: 2019-07-31

Fin: 2020-01-31

Temperatura: 40° ± 2°C

Humedad relativa: 75 ± 5 %

Tiempo	Descripción Aspecto*	Identificación de tioconazol**	Cuantificación de Tioconazol (2,70-3,30%)	Esterilidad	Agente antimicrobiano	
					Metilparabeno (0,040-0,060%)	Propilparabeno (0,008-0,012%)
Inicio	Conforme*	Positivo	2,93 %	Estéril	0,045%	0,009%
3 meses	Conforme*	Positivo	3,00 %	Estéril	0,045%	0,009%
6 meses	Conforme*	Positivo	2,75 %	Estéril	0,045%	0,009%

*Preparación de consistencia blanda, blanquecina, homogénea

** El tiempo de retención del pico principal corresponde con el pico principal DEL estándar según se obtiene en la cuantificación.



Responsable



Jefe de Control de Calidad

FABRICANTE : LABORATORIOS LANSIER S.A.C.

PRODUCTO : TIOCONAZOL 6,5% Ungüento Oftálmico

LOTE : 10739
TAMAÑO DE LOTE : 2 kilos
TIPO DE LOTE : Piloto
FABRICADO : 2019-07-16
VENCIMIENTO : Por Determinar
MATERIA PRIMA : Tioconazol lote Y21501129
ENVASE : Tubo blanco colapsible laminado de polietileno de baja densidad/aluminio/polietileno de baja densidad
TIEMPO DE VIDA UTIL : Por Determinar
METODOLOGÍA : Técnica Propia

RESULTADOS DE LAS PRUEBAS DE ESTABILIDAD ACELERADA

Duración: 06 meses

Inicio: 2019-07-31

Fin: 2020-01-17

Temperatura: 40° ± 2°C

Humedad relativa: 75 ± 5 %

Tiempo	Descripción Aspecto*	Identificación de tioconazol**	Cuantificación de Tioconazol (5,85-7,15%)	Esterilidad	Agente antimicrobiano	
					Metilparabeno (0,040-0,060%)	Propilparabeno (0,008-0,012%)
Inicio	Conforme*	Positivo	6,10 %	Estéril	0,040%	0,0089%
3 meses	Conforme*	Positivo	6,04 %	Estéril	0,040%	0,008%
6 meses	Conforme*	Positivo	6,10 %	Estéril	0,040%	0,008%

*Preparación de consistencia blanda, blanquecina, homogénea

** El tiempo de retención del pico principal corresponde con el pico principal DEL estándar según se obtiene en la cuantificación.



Responsable



Jefe de Control de Calidad

Anexo 3: Reporte de Efecto Antimicótico de las Formulas de Tioconazol 1%, 3% y 6.5% ungüento oftálmico.

INFORME EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTIMICOTICO DE TIOCONAZOL

Producto: TIOCONAZOL

Lote: 10719(1%), 10729(3%), 10739(6,5%), 11019(0,1%), 11029(0,1%)

Lugar: Laboratorio de Microbiología – Laboratorios Lansier S.A.C

Realizado por: Roberto Cayo – Roberto Orihuela

Fecha: Febrero - 2020

OBJETIVO:

Evaluar la capacidad del producto TIOCONAZOL de inhibir hongos y levaduras

MATERIALES

Medios de cultivo:

Agar Sabouraud Glucosa

Agar Malta Levadura

Cepas:

Candida Albicans ATCC® 10231

Aspergillus brasiliensis ATCC® 16404 (Para Estudio Referencial)

Fusarium keratoplasticum ATCC® 36031 (Para Estudio Referencial)

Otros:

Tetrabutilamonio dihidrógeno ortofodfato

Placa petri descartable 90 x 15 mm

Placa petri descartable 90 x 20 mm

DISEÑO EXPERIMENTAL

Solución Buffer:

Disolver 1,7 g de tetrabutilamonio dihidrógeno ortofodfato en 1L de agua purificada. Ajustar el pH a $7,4 \pm 0,2$ con hidróxido de amonio 2M. Esterilizar a 121°C x 30 min.

Solución muestra:

Pesar exactamente una determinada cantidad de muestra e incorporarlo en un tubo conteniendo Solución Buffer, calentar a 60°C , con ayuda de un vortex agitar la mezcla por aproximadamente 1 min, observar que la mayor parte de unguento se adhiere a las paredes del tubo. Dejar enfriar y transferir la parte acuosa a otro recipiente.

Reactivación y dilución de Microorganismos:

Para las pruebas se usaron las siguientes cepas:

- *Candida albicans* ATCC 10231
- *Aspegillus brasiliensis* ATCC 16404 (Para Estudio Referencial)
- *Fusarium keratoplasticum* ATCC 36031 (Para Estudio Referencial)

Cada cepa se siembra en toda la superficie de una placa de Agar Malta Levadura, se incuba a una temperatura de 20-25°C por 2 a 5 días.

Después de incubar, recolectar el organismo de las placas con aproximadamente 9 mL de solución salina estéril usando un asa de siembra. Pipetear y transferir la suspensión a un tubo de vidrio estéril. Ésta es la suspensión de recolección.

Diluir aproximadamente 1 mL de la suspensión de recolección con 9 mL de solución salina estéril. Usando el espectrofotómetro de UV-visible, medir el % de transmitancia a 580 nm. El valor deseado es aproximadamente 25% de transmitancia a 580 nm.

Con ayuda de una micropipeta, tomar 0,2 mL de esta suspensión y agregarla en 100 mL de agar Malta Levadura licuado y mantenido a 45°C aproximadamente. Agregar el medio inoculado en placas Petri en cantidades que dependerá del tipo e prueba

Preparación de las placas:

Pueden ser de material descartable, o de vidrio tipo Pyrex que soporte esterilización por calor seco. Para las pruebas que se requiera excavación o disco de papel filtro, se prefiere usar placas de 15x100 mm, a la cual se le agrega 25 mL de medio inoculado; o placas de 15 x 90mm, que se le agrega 21 mL de medio inoculado. Para las pruebas que requiera uso de cilindros se usarán placas de 20x90 mm o 20x100mm, a las cuales se les agregará 17 y 21 mL respectivamente de Agar Malta Levadura sin inóculo, como base; y 4 mL de medio con inóculo, como capa para ambos tipos de placa. Esperar 20 minutos aproximadamente para que el medio solidifique.

Preparación de los cilindros:

Deben ser de acero quirúrgico y tienen las siguientes medidas: 8 mm de diámetro externo, 6 mm de diámetro interno y 10 mm de longitud. Estas dimensiones tienen una tolerancia de ± 0.1 mm.

Esterilizar por calor seco o calor húmedo y dentro de un recipiente debidamente cerrado.

Preparación del sacabocado:

Deben ser de acero quirúrgico y la punta de penetración del medio tiene las siguientes medidas aproximadas: 8 mm de diámetro externo, 7.4 mm de diámetro interno. Esterilizar por calor seco o calor húmedo debidamente envueltos.

Preparación de los discos de papel filtro:

A partir de papel whatman N°1 generar discos con ayuda de un perforador común de oficina. Esterilizar en calor seco o calor húmedo. Si se esteriliza por calor húmedo, antes de su uso secar en estufa a 50 °C por 1 horas.

Enfrentamiento:

Para el método excavación en placa, en una placa con medio inoculado, con el sacabocado punzar el medio hasta un máximo de 6 puntos ubicados de manera equidistante. Retirar las porciones de agar con ayuda de una aguja estéril. Inocular las cavidades con 25 a 100 uL de muestra a evaluar.

Para el método de discos, con ayuda de pinza estéril, colocar un máximo de 6 discos por placa, todos equidistantes, inocular 10 uL de muestra a evaluar en cada disco.

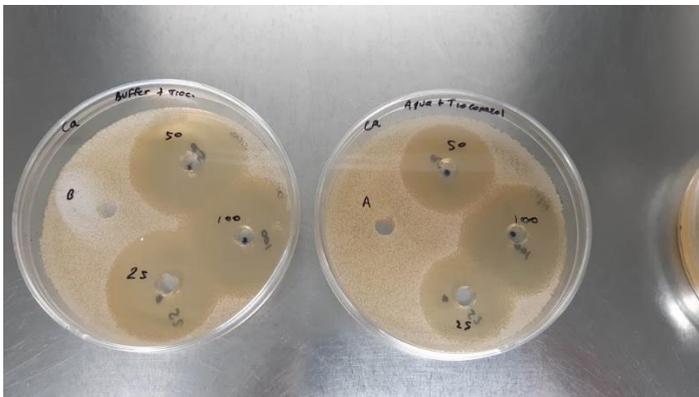
Para el método cilindro placa, en una placa con medio inoculado, colocar hasta un máximo de 6 cilindros ubicados de manera equidistante. Inocular los cilindros con 25 a 100 uL de muestra a evaluar.

RESULTADOS

1. Comparación de los métodos de disco, Excavación y cilindro. Comparación de extracción con Buffer y con agua purificada

- Muestras: Tioconazol 3%
- Dilución de la muestra: 1g en 75 mL de Buffer o agua purificada
- Cantidad inoculada en disco: 10 uL
- Cantidad Inoculada en Agujero de excavación: 25uL, 50uL y 100uL
- Cantidad Inoculada en cilindro: 25uL, 50uL y 100uL
- Resultados:

C. albicans Vs. Tioconazol: método excavación

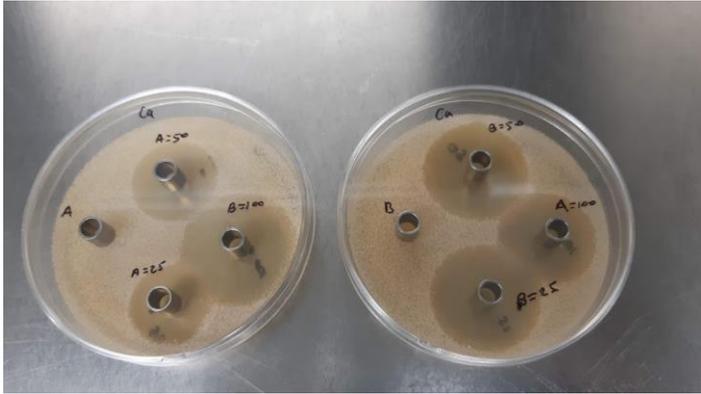


A: Control negativo del Agua. Se inoculó 100uL de Agua purificada

B: Control negativo del Buffer. Se inoculó 100uL de Buffer

Placa de la izquierda, extracción con buffer; placa de la derecha, extracción con agua. Se observan Halos más grandes en la extracción con buffer

C. albicans Vs. Tioconazol: método cilindro placa



A: Control negativo del Agua. Se inoculó 100uL de Agua purificada
 B: Control negativo del Buffer. Se inoculó 100uL de Buffer

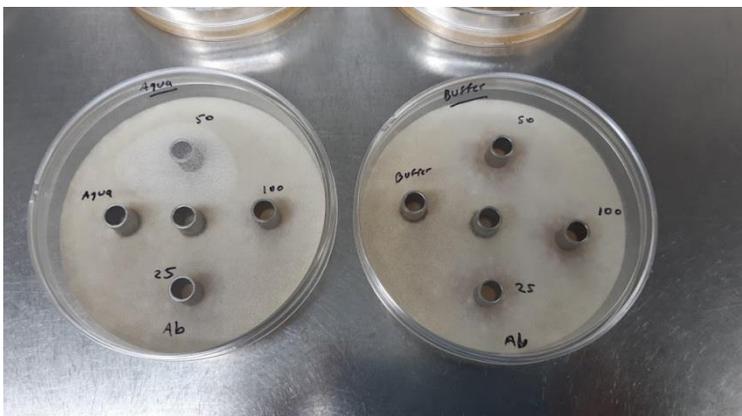
Placa de la izquierda, extracción con agua; placa de la derecha, extracción con buffer.
 Se observan Halos más grandes en la extracción con buffer

Aspergillus brasiliensis Vs. Tioconazol: método excavación



Placa de la izquierda, extracción con buffer; placa de la derecha, extracción con agua.
 Se observan Halos más definidos en la extracción con buffer

Aspergillus brasiliensis Vs. Tioconazol: método cilindro placa



Placa de la izquierda, extracción con agua; placa de la derecha, extracción con buffer.
 Se observan Halos más definidos en la extracción con buffer

A. *Brasiliensis* y *C. albicans* Vs. Tioconazol: método disco

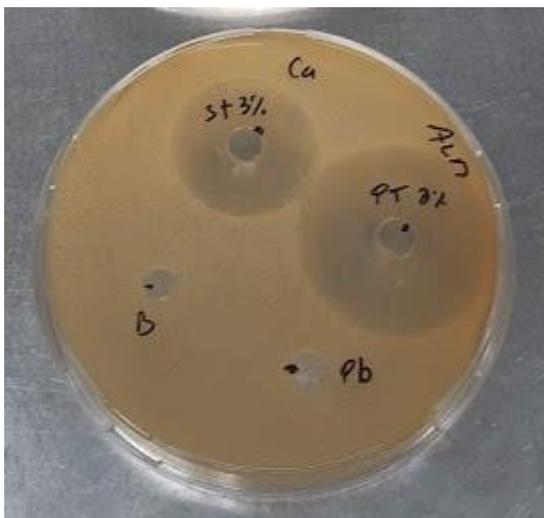


Placa de la izquierda, enfrentamiento con *C. albicans*, extracción con agua y con buffer. Placa de la derecha, enfrentamiento con *A. brasiliensis*, extracción con agua y con buffer. En caso de *C. albicans* se observan Halos más definidos en la extracción con buffer, mientras que en *A. brasiliensis* los halos no se distinguen bien.

El uso de discos a partir de papel filtro dificulta o limita el inóculo a un volumen de 10 uL. El método de excavación y cilindros permite inocular mayor volumen hasta 100 uL. El método de cilindro es más sensible a movimientos de tal manera que puede producir halos irregulares, mientras que el método por excavación, retirar las porciones excavadas puede resultar un poco dificultoso. Pero si se tienen los cuidados adecuados tanto excavación como cilindro producen buenos halos.

2. Evaluación del efecto de placebo, MP diluido al 3%, y Producto Tioconazol al 3%

- Muestras: Tioconazol 3%
- Dilución de la muestra: 0,5g en 75 mL de Buffer o agua purificada
- Cantidad inoculada en excavación: 100 uL
- Resultados:

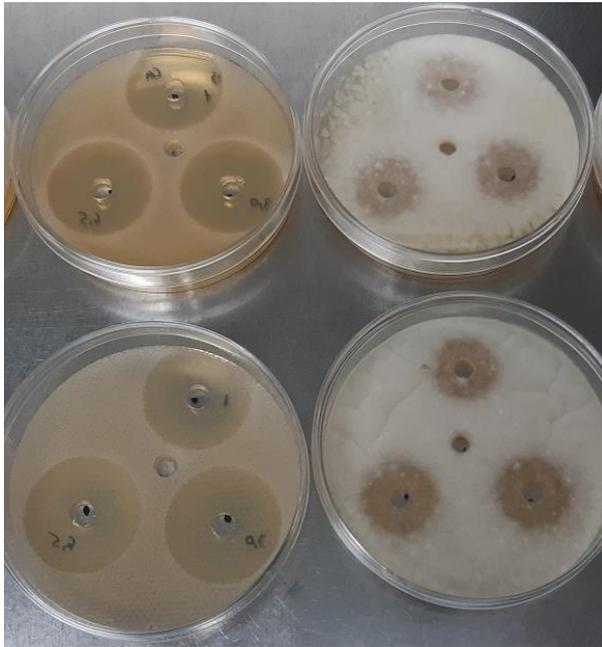


PB: placebo, se observa que no produce respuesta o presencia de halo
B: buffer, se observa que no produce respuesta o presencia de halo.

Se determina que la respuesta de los halos es producto de la extracción del tioconazol.

3. Determinando la concentración de solución muestra a evaluar según microorganismo

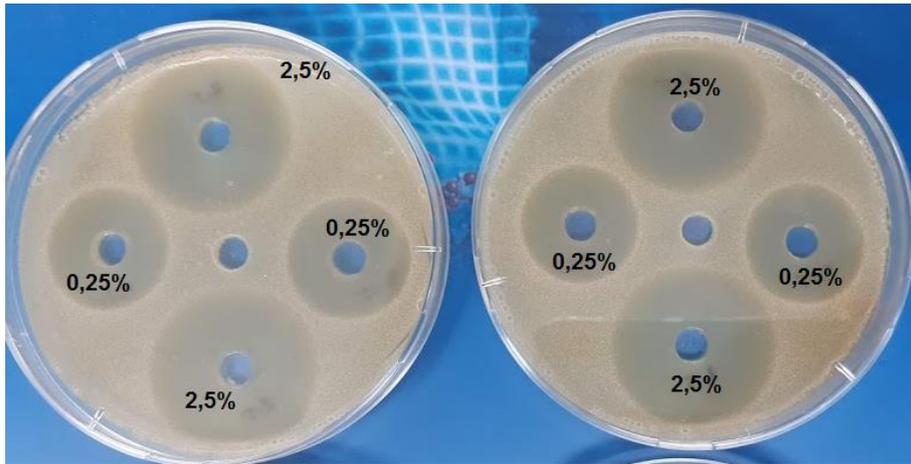
- Muestras: Tioconazol 1%, 3% y 6,5%
- Dilución de la muestra: para enfrentar *A. brasiliensis* se diluye 2g de producto en 30 mL de Buffer (producto diluido al 6,7%), para enfrentar *C. albicans* se diluye 2g de producto en 30 mL de Buffer, luego se toma 1 mL y se diluye en 5 mL de buffer (productos diluido al 1,3%)
- Cantidad Inoculada en Agujero de excavación: 100uL
- Resultados:



La dilución del producto al 6,7% permite formar halos adecuados para el caso de *A. brasiliensis*, mientras que la dilución del producto al 1,3% aún no es propicio para *C. albicans* pues produce halos muy grandes.

4. Evaluación Tioconazol 0,1% contra *Candida albicans*

- Muestras: Tioconazol 0,1%
- Cepa enfrentada: *C. albicans*.
- Dilución de cepa: tramitancia 25%, 0,3 mL inóculo/100mL de medio
- Dilución de la muestra: 0,5g de producto en 20 mL de Buffer (productos diluidos al 2,5%) luego se toma 1 mL y se diluye en 9 mL de buffer (producto diluido al 0,25%)
- Método: Excavación
- Cantidad Inoculada: 100uL
- Resultados:



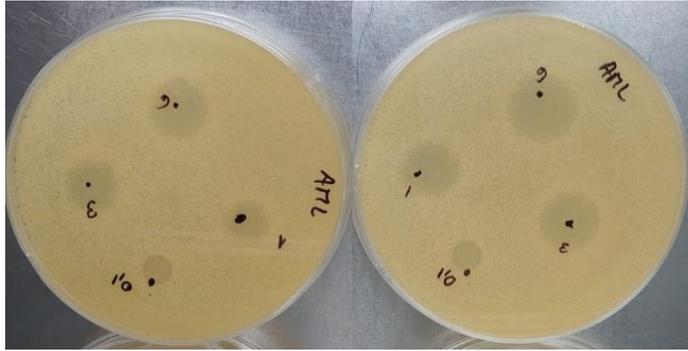
Los halos en las 2 concentraciones observadas son:

lote 11019		lote 11029			
2,5%	0,25%	2,5%	0,25%		
33,15	25,01	33,19	24,19		
32,92	24,81	33,43	24,20		
33,73	25,12	33,64	24,01		
33,19	24,00	33,48	24,63		
33,22	25,38	33,63	24,52		
33,41	24,57	33,83	23,94		
33,60	24,30	33,83	24,29		
33,65	24,36	33,49	24,40		
Promedio	33,36	24,69	Promedio	33,57	24,27

Por lo que para el producto Tioconazol al 0,1%, la dilución adecuada para *C. albicans* es diluciones del producto menores al 0,25%

5. Comparando las diferentes concentraciones de Tioconazol Vs *C. albicans*.

- Muestras: Tioconazol 0,1%, 1%, 3% y 6,5%
- Cepa enfrentada: *C. albicans*.
- Dilución de cepa: tramitancia 25%, 0,3 mL inóculo/100mL de medio
- Dilución de la muestra: 0,5g de producto en 10 mL de Buffer, luego se toma 0,1 mL y se diluye en 9 mL de buffer (productos diluido al 0,05%)
- Método: Excavación
- Cantidad Inoculada: 100uL
- Resultados:

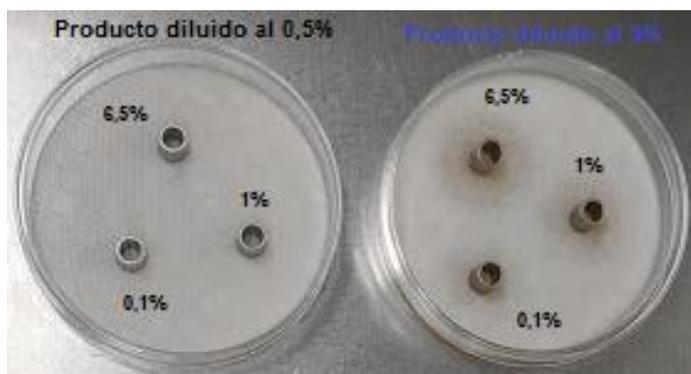


Medida de los halos en mm

	0,1%	1%	3%	6,5%
	7,66	12,23	14,49	16,89
	7,06	12,43	13,76	15,56
	7,31	12,03	13,83	15,30
	7,12	12,07	13,71	15,89
Promedio	7,29	12,19	13,95	15,91

6. Evaluación del efecto de Tioconazol contra *Fusarium keratoplasticum*

- Muestras: Tioconazol 0,1%, 1%, y 6,5%
- Cepa enfrentada: *Fusarium keratoplasticum*.
- Dilución de cepa: tramitancia 25%, 0,3 mL inóculo/100mL de medio
- Dilución de la muestra: 0,5g de producto en 10 mL de Buffer (producto diluido al 5%), luego se toma 1 mL y se diluye en 9 mL de buffer (productos diluido al 0,5%)
- Método: Cilindro PLaca
- Cantidad Inoculada: 100uL
- Resultados:



Medida de los halos en mm

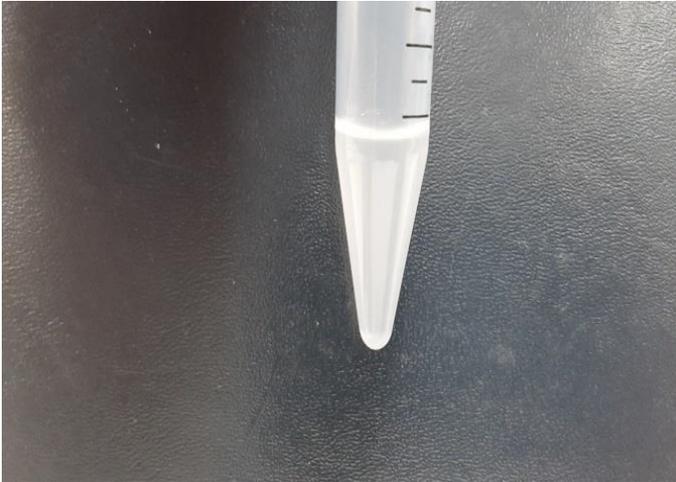
0,1%	1%	6,5%
15,29	19,43	25,57

	15,11	20,51	26,88
	14,82	20,20	26,30
	15,10	19,91	26,21
Promedio	15,08	20,01	26,24

Se observa halo de inhibición por efecto del tioconazol, pero el desarrollo de las hifas no permite obtener halos bien definidos

Anexo 5: Queratitis Fúngica del Tioconazol 1%, 3% y 6,5% Ungüento Oftálmico in vivo

Inoculo de *Candida albicans* y Administración del inoculo de *Candida albicans*



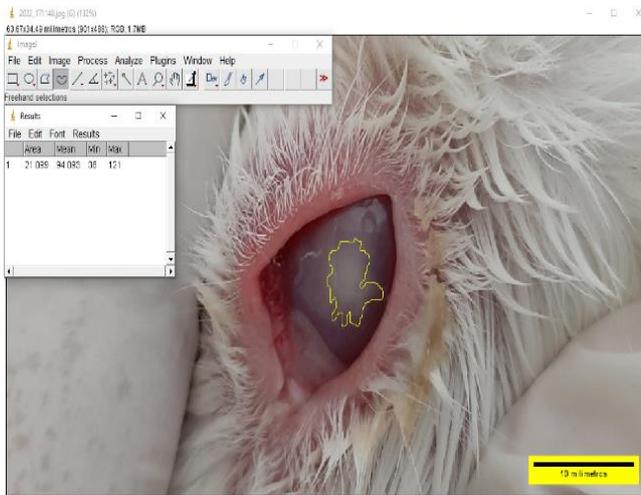
CONTROL - Día 3



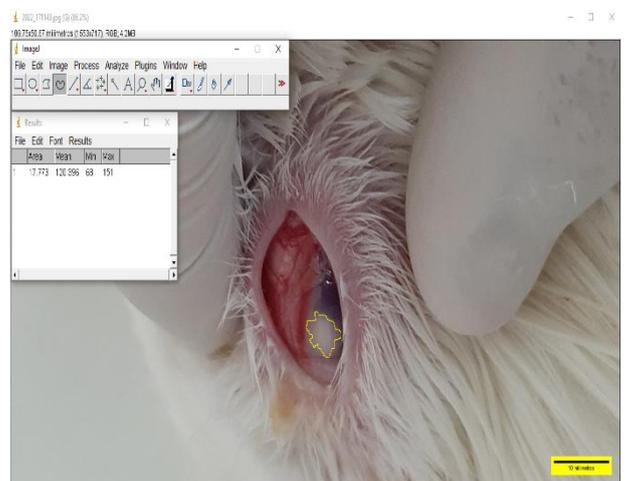
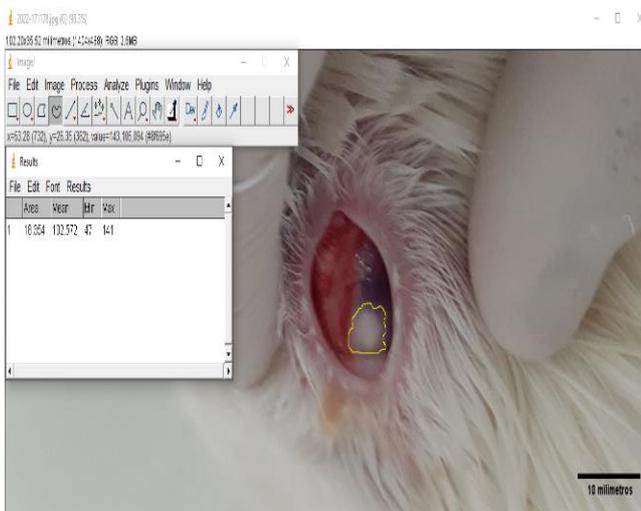
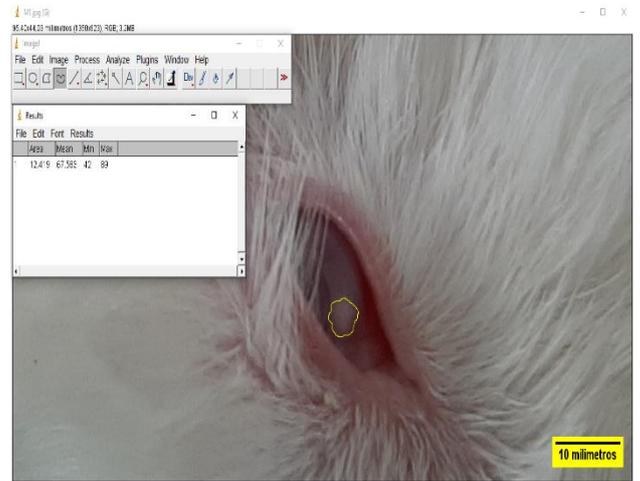
CONTROL - Día 7



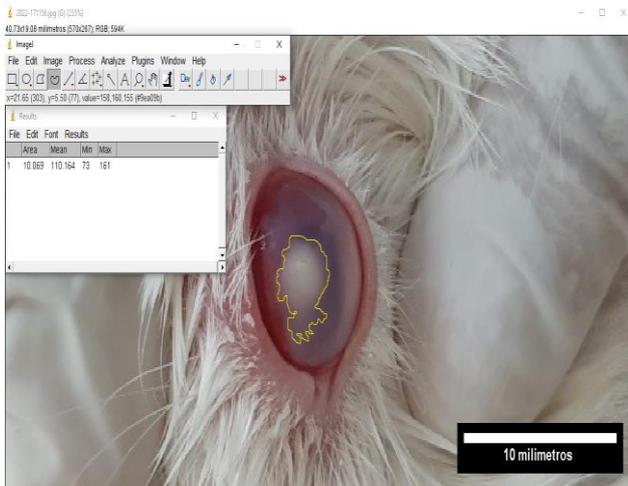
MUESTRA 1% - Día 3 (Ojo inducido)



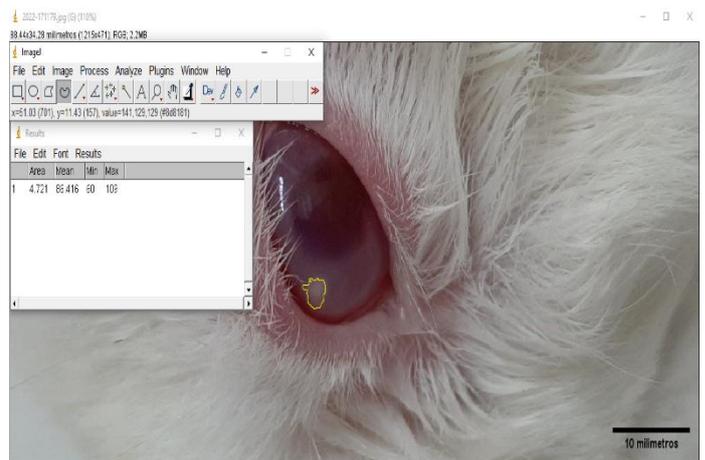
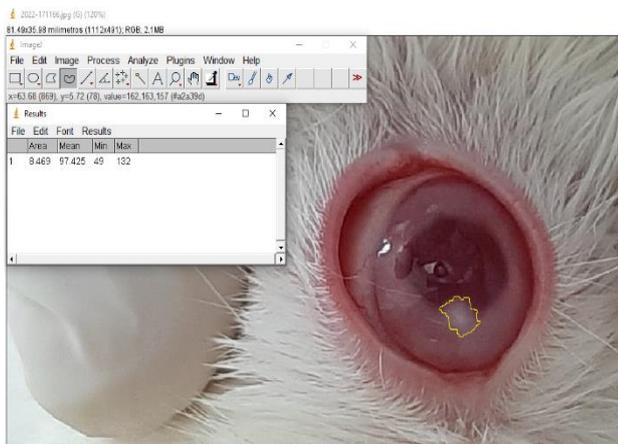
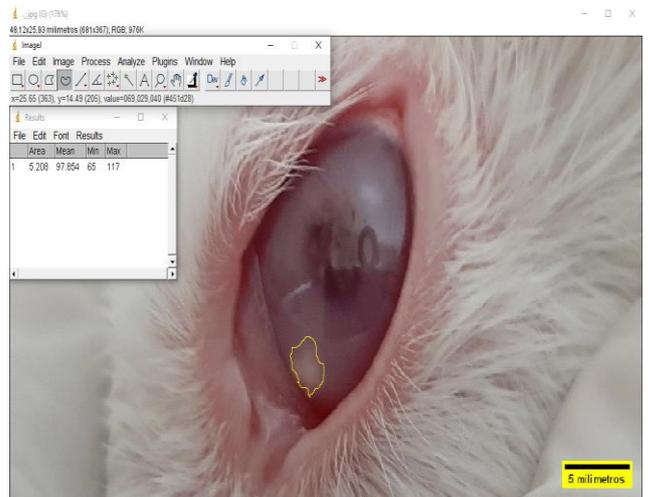
MUESTRA 1% - Día 7 (Ojo



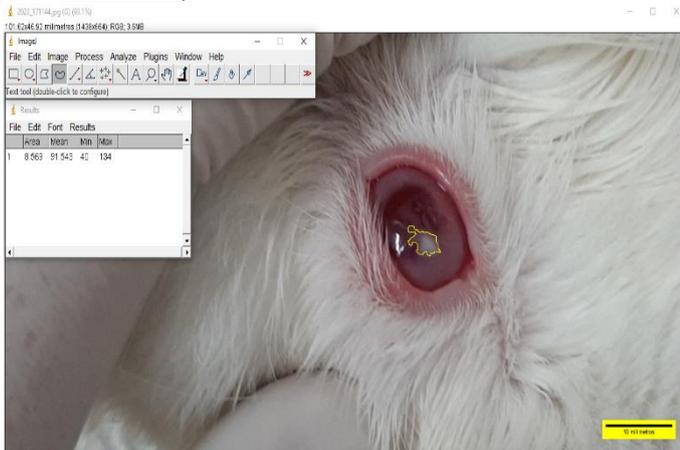
MUESTRA 3 % - Día 3 (Ojo inducido)



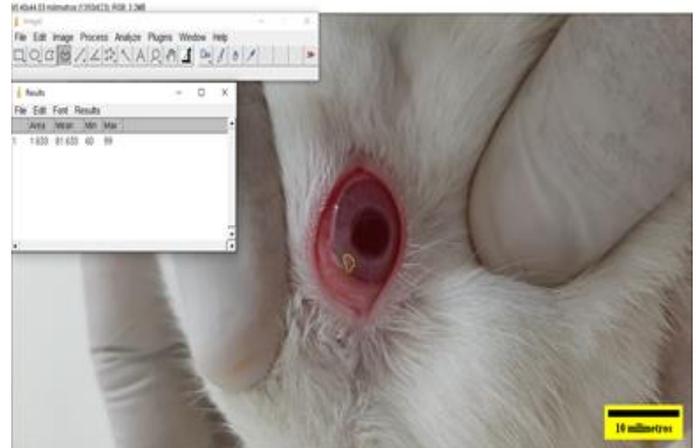
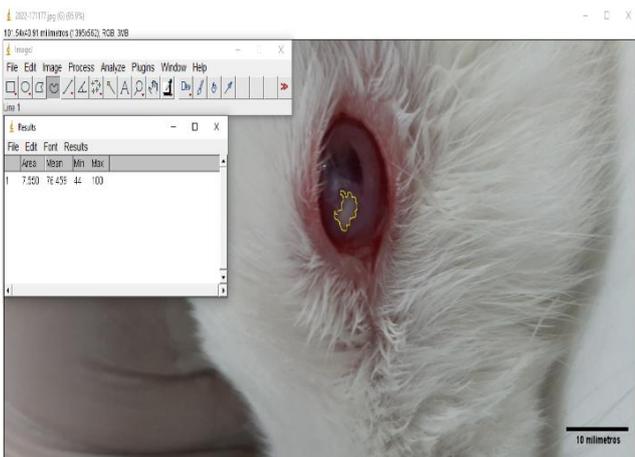
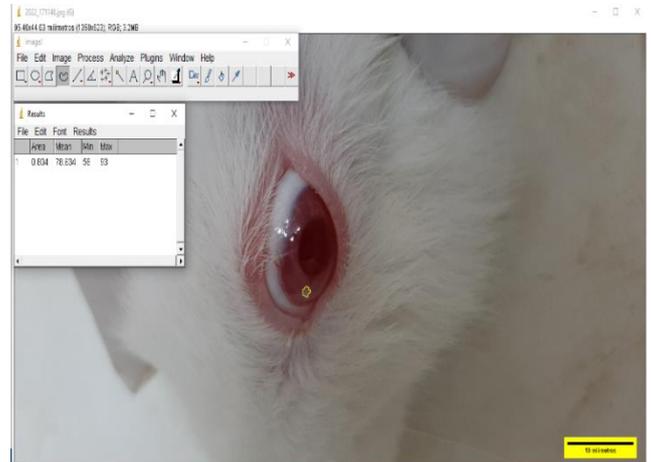
MUESTRA 3 % - Día 7 (Ojo inducido)



MUESTRA 6,5 % - Día 3 (Ojo inducido)



MUESTRA 6,5 % - Día 7 (Ojo)



Cálculos Estadísticos de los Resultados:

ANOVA de un solo factor: Dia 7 CC1; Dia 7 CC3; Dia 7 ... ; Dia 7 Control

Método

- | | |
|-------------------|---------------------------------|
| Hipótesis nula | Todas las medias son iguales |
| Hipótesis alterna | No todas las medias son iguales |

Nivel de significancia $\alpha = 0.05$

Se presupuso igualdad de varianzas para el análisis.

Información del factor

Factor	Niveles	Valores
Factor	4	Dia 7 CC1; Dia 7 CC3; Dia 7 CC6.5; Dia 7 Control

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Factor	3	34750.8	11583.6	359.01	0.000
Error	24	774.4	32.3		
Total	27	35525.2			

Resumen del modelo

S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
5.68023	97.82%	97.55%	97.03%

Medias

Factor	N	Media	Desv.Est.	IC de 95%
Dia 7 CC1	7	24.77	10.02	(20.34; 29.20)
Dia 7 CC3	7	6.242	2.559	(1.811; 10.673)
Dia 7 CC6.5	7	1.112	0.357	(-3.319; 5.543)
Dia 7 Control	7	89.49	4.70	(85.06; 93.92)

Desv.Est. agrupada = 5.68023

Comparaciones en parejas de Tukey

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

Factor	N	Media	Agrupación
Dia 7 Control	7	89.49	A
Dia 7 CC1	7	24.77	B
Dia 7 CC3	7	6.242	C
Dia 7 CC6.5	7	1.112	C

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes

Resultados después de 7 días de tratamiento con las 3 concentraciones de Tioconazol:				
Conejos	Placebo	Tioconazol 1%	Tioconazol 3%	Tioconazol 6.5%
1	80.94	12.419	10.342	0.804
2	88.76	17.773	5.208	0.837
3	86.45	20.415	9.043	1.169
4	93.46	42.097	6.586	1.573
5	90.01	33.253	4.721	0.837

6	94.61	25.589	4.17	1.633
7	92.18	21.836	3.625	0.929
Promedio:	89.49	24.77	6.24	1.11
Mediana:	90.01	21.84	5.21	0.93
% de Reduccion de la Lesion:	NA	72%	93%	99%

Anexo 6: Reporte de Validación del Método Analítico de Tioconazol.

REPORTE DE VALIDACION DE TECNICA ANALITICA PARA CUANTIFICACION DE TIOCONAZOL EN TIOCONAZOL UNGÜENTO OFTÁLMICO

RESULTADOS Y TRATAMIENTO ESTADÍSTICO

1.7. Selectividad:

1.7.1. Determinación de interferencias de los excipientes:

1.7.1.1. El coeficiente de variación del St_1 es conforme:

$$\boxed{\text{C.V.} = 0,71 \%} \quad (\text{C.V.} \leq 2\%)$$

1.7.1.2. Los Check estándares son conformes:

$$\boxed{\text{Chst} = 0,05\%} \quad (\text{Chst} \leq 1\%)$$

1.7.1.3. Los resultados de la muestra al 100% son conformes:

$$\boxed{\text{Concentración} = 6,495\%}$$

$$(5,85\% \leq \text{Concentración} \leq 7,15\%)$$

1.7.1.4. La respuesta obtenida del placebo es conforme:

$$\boxed{\text{Respuesta} = 0,0\%} \quad (\text{Respuesta} \leq 1\%)$$

1.7.2. Determinación de productos de degradación:

1.7.2.1. La muestra que sufre la hidrólisis ácida muestra 1 pico a los 3,48 minutos dando una resolución con el pico del Tioconazol respectivamente dentro de la especificación:

$$\boxed{\text{Resolución} = 20,9} \quad (\text{Resolución} \geq 1)$$

$$(\text{Resolución} \geq 1)$$

1.7.2.2. La muestra que sufre oxidación muestra 5 picos a los 1,70; 1,99; 2,38; 2,72 y 3,48 minutos dando una resolución con el pico del Tioconazol respectivamente dentro de la especificación.

Resolución = 20,55; 20,56; 20,55; 20,56; y 20,56 (Resolución ≥ 1)

1.8. Linealidad:

1.8.1. Linealidad del Sistema:

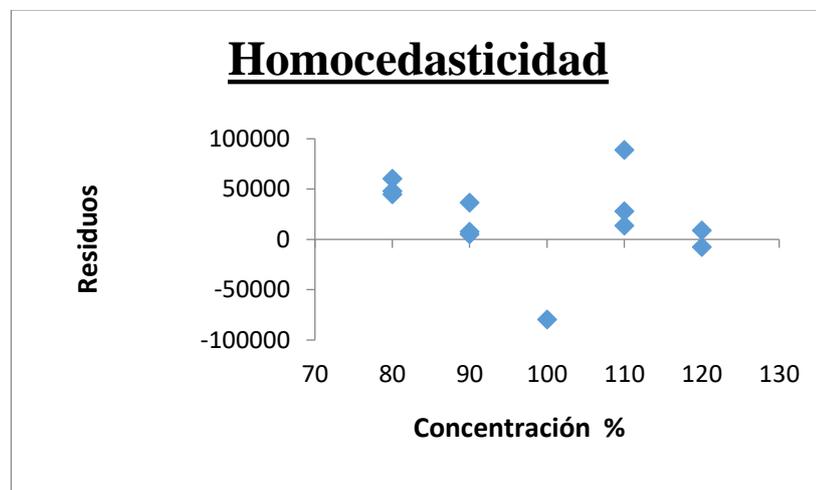
1.8.1.1. El coeficiente de correlación (r) es conforme:

$r = 0,999$ ($r \geq 0,999$)

1.8.1.2. El coeficiente de determinación (r^2) es conforme:

$r^2 = 0,997$ ($r^2 \geq 0,990$)

1.8.1.3. La Homocedasticidad es conforme, la distribución de los puntos es aleatoria y no refleja ninguna tendencia.



1.8.1.4. En la Normalidad de los residuales:

- El F_{1exp} es conforme.

$F_{1exp} = 4837,79$ $F_{1tabla} = 2,5$ ($\alpha=0,05$, $n_n=4$, $n_d=70$)
($F_{1exp} > F_{1tabla}$)

- El F_{2exp} es conforme.

$F_{2exp} = 1,36$ $F_{2tabla} = 2,5$ ($\alpha=0,05$, $n_n=4$, $n_d=70$)

$$(F_{2\text{exp}} < F_{2\text{tabla}})$$

1.8.1.5. En el test de Cochran el G_{exp} es conforme.

$$G_{\text{exp}} = 0,4707$$

$$G_{\text{tabla}} = 0.6838 (\alpha=0,05, k=5, n=3) \\ (G_{\text{exp}} < G_{\text{tabla}})$$

1.8.1.6. En el test de verificación de la pendiente:

- El C.V. es conforme.

$$\text{C.V.} = 1,44\% \quad (\text{C.V.} \leq 2\%)$$

- El t_{exp} es conforme.

$$t_{\text{exp}} = 69,55$$

$$t_{\text{tabla}} = 2,16 (\alpha=0.05, n-2=13\text{gl}) \\ (t_{\text{exp}} > t_{\text{tabla}})$$

- El intervalo de confianza es conforme ya que no incluye al cero.

$$\text{Límite inferior} = 110358,26$$

$$\text{Límite superior} = 117432,28$$

1.8.1.7. En el test de verificación de la variable independiente:

- El t_{exp} es conforme.

$$t_{\text{exp}} = 2,14$$

$$t_{\text{tabla}} = 2.16 (\alpha=0.05, n-2=13\text{gl}) \\ (t_{\text{exp}} < t_{\text{tabla}})$$

- El intervalo de confianza es conforme ya que incluye al cero.

$$\text{Límite inferior} = -711930,60$$

$$\text{Límite superior} = 2509,94$$

1.8.1.8. El coeficiente de variación de los factores de respuesta es conforme.

$$\text{C.V.} = 0,86\% \quad (\text{C.V.} \leq 2\%)$$

1.8.2. Linealidad del Método:

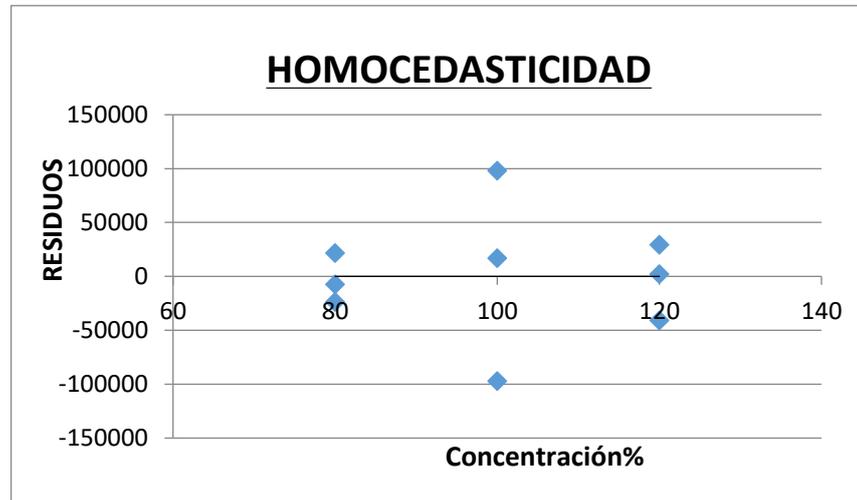
1.8.2.1. El coeficiente de correlación (r) es conforme.

$$r = 0,9996 \quad (r \geq 0,999)$$

1.8.2.2. El coeficiente de determinación (r^2) es conforme.

$$r^2 = 0,9992 \quad (r^2 \geq 0,990)$$

1.8.2.3. La Homocedasticidad es conforme, la distribución de los puntos es aleatoria y no refleja ninguna tendencia.



1.8.2.4. En la Normalidad de los residuales:

- El F_{1exp} es conforme.

$$F_{1exp} = 9235,13 \quad F_{1tabla} = 3,4 \quad (\alpha=0.05, n_n=2, n_d=24) \\ (F_{1exp} > F_{1tabla})$$

- El F_{2exp} es conforme.

$$F_{2exp} = 0,03 \quad F_{2tabla} = 3,4 \quad (\alpha=0.05, n_n=2, n_d=24) \\ (F_{2exp} < F_{2tabla})$$

1.8.2.5. En el test de Cochran el G_{exp} es conforme.

$$G_{exp} = 0,40 \quad G_{tabla} = 0,8709 \quad (\alpha=0.05, k=3, n=3) \\ (G_{exp} < G_{tabla})$$

1.8.2.6. En el test de verificación de la pendiente:

- El C.V. es conforme.

$$C.V. = 1,04\% \quad (C.V. \leq 2\%)$$

- El t_{exp} es conforme.

$$t_{exp} = 96,10 \quad t_{tabla} = 2,365 \quad (\alpha=0.05, n-2=7gl) \\ (t_{exp} > t_{tabla})$$

- El intervalo de confianza es conforme ya que no incluye al cero.

$$\text{Límite inferior} = 109647,49$$

$$\text{Límite superior} = 115180,482$$

1.8.2.7. En el test de verificación de la variable independiente:

- El t_{exp} es conforme.

$$t_{\text{exp}} = 1,5052$$

$$t_{\text{tabla}} = 2,365 \quad (\alpha=0.05, n-2=7\text{gl}) \\ (t_{\text{exp}} < t_{\text{tabla}})$$

- El intervalo de confianza es conforme ya que incluye al cero.

$$\text{Límite inferior} = -458718,41$$

$$\text{Límite superior} = 101912,63$$

1.8.2.8. El coeficiente de variación de los factores de respuesta es conforme.

$$\text{C.V.} = 0,57\% \quad (\text{C.V.} \leq 2\%)$$

1.9. Precisión:

1.9.1. Precisión del Sistema:

1.9.1.1. El área promedio de las 06 inyecciones de estándar fue de 11126354 con un C.V. conforme.

$$\text{C.V.} = 0,16\% \quad (\text{C.V.} \leq 2\%)$$

1.9.1.2. El tiempo de retención promedio de las 06 inyecciones de estándar fue de 7,74 minutos con un C.V. conforme.

$$\text{C.V.} = 0,18\% \quad (\text{C.V.} \leq 2\%)$$

1.9.1.3. Los platos teóricos promedio de las 06 inyecciones de estándar fue de 7251,67 con un C.V. conforme.

$$\text{C.V.} = 1,95\% \quad (\text{C.V.} \leq 2\%)$$

1.9.1.4. La asimetría promedio de las 06 inyecciones de estándar fue de 1,25875 con un C.V. conforme.

$$\text{C.V.} = 1,76\% \quad (\text{C.V.} \leq 2\%)$$

1.9.2. Precisión del Método (Repetibilidad):

1.9.2.1. El coeficiente de variación del St_1 es conforme.

$$\text{C.V.} = 0,16\% \quad (\text{C.V.} \leq 2\%)$$

1.9.2.2. Los Check estándares son conformes.

$$\text{Chst} = 0,26\% \quad (\text{Chst} \leq 1\%)$$

1.9.2.3. El Promedio de las concentraciones de las 06 muestras del lote 10718 de Tioconazol 6,5% Ungüento Oftálmico fue 6,6% Su C.V es conforme.

$$\text{C.V.} = 0,18\% \quad (\text{C.V.} \leq 2\%)$$

1.9.2.4. Los límites de confianza individual y promedio son:

$$\text{Confianza individual} = 6,60\% \pm 0,0311\%$$

$$\text{Confianza promedio} = 6,60\% \pm 0,0127\%$$

1.9.3. Precisión del Método (Precisión Intermedia):

1.9.3.1. El coeficiente de variación del St_1 es conforme.

$$\text{C.V.} = 0,14\% \quad (\text{C.V.} \leq 2\%)$$

1.9.3.2. Los Check estándares fueron conformes.

$$\text{Chkst} = 0,11\% \quad (\text{Chst} \leq 1\%)$$

1.9.3.3. El Promedio de las concentraciones de las 12 muestras del lote de Tioconazol 6,5% Ungüento Oftálmico. Su Desvest fue 0,083%, es conforme.

$$\text{C.V.} = 1,27\% \quad (\text{C.V.} \leq 4\%)$$

1.9.3.4. Los límites de confianza individual y promedio son:

$$\text{Confianza individual} = 6,53\% \pm 0,1829\%$$

$$\text{Confianza promedio} = 6,53\% \pm 0,0528\%$$

1.10. Exactitud:

1.10.1. El coeficiente de variación del St_1 fue 0,14%, siendo la especificación $\leq 2\%$.

$$\text{C.V.} = 0,14\% \quad (\text{C.V.} \leq 2\%)$$

1.10.2. Los Check estándares fueron en promedio 0,11%, siendo la especificación $\leq 1\%$.

$$\text{Chst} = 0,11\% \quad (\text{Chst} \leq 1\%)$$

1.10.3. El porcentaje de recuperación es conforme.

$$\% \text{ Recuperación} = 100,39\% \quad (97,0\% \leq \% \text{ recuperación} \leq 103,0\%)$$

1.10.4. El C.V. es conforme.

$$\text{C.V.} = 0,57\% \quad (\text{C.V.} \leq 1,5\%)$$

1.10.5. El t_{exp} es conforme.

$$t_{\text{exp}} = 0,02 \quad t_{\text{tabla}} = 2,306 \quad (\alpha=0.05, n-1=8\text{gl})$$
$$(t_{\text{exp}} < t_{\text{tabla}})$$

1.10.6. El G_{exp} resultó 0,55; siendo la especificación menor al G_{tabla} que es 0,8709 ($\alpha=0.05, k=3, n=3$).

$$G_{\text{exp}} = 0,85 \quad G_{\text{tabla}} = 0,8709 \quad (\alpha=0.05, k=3, n=3)$$
$$(G_{\text{exp}} < G_{\text{tabla}})$$

1.11. Robustez:

1.11.1. Los coeficientes de variación de los Estándares son conformes $< 2\%$

1.11.2. Los resultados promedios obtenidos de cada experimento fueron:

Experimento	conc. calc. %	Diferencia %
1	6,4671	---
2	6,5213	1,77%
3	6,4689	0,95%
4	6,5506	1,19%
5	6,3900	1,49%
6	6,4027	1,62%
7	6,5118	0,43%
8	6,4254	0,99%

1.11.3. En el cálculo de efectos se determinó que no hay un factor crítico o de mayor influencia ante las variaciones en los parámetros del método

Cálculo de los Efectos:

Factor	Efecto
A	0,06951
B	-0,00648
C	-0,02194
D	0,01072
E	-0,06095
F	-0,01785
G	0,03165

1.11.4. Se considera que el método analítico es robusto puesto que no hay alteraciones significativas en los resultados obtenidos.

1.12. Rango:

1.12.1. Luego de cumplir con los parámetros de precisión, linealidad y exactitud del método, se otorga conformidad a la concentración final de la muestra y estándar, de 0,2mg/mL equivalente a 200 ppm. El rango de trabajo es de 80% a 120%, es decir concentraciones finales de 160 ppm a 240 ppm.

PRECISE CHEMIPHARMA PVT. LTD.

C-384, TTC, Industrial Area, M.I.D.C., Pawne Village, Nashik - 400 702, India.

Tel: +91-22-2761 7500 / 6528 8305 Telefax: +91-22-2761 7512

CERTIFICATE OF ANALYSIS

PRODUCT NAME: Ticlopidine BP

Specification No.	QAVTS/09/TC2	Iss. Date	Apr 2015	Mfg Qty	2.090 kg
Batch No.	TC2X0242015	Recd Date	Mar 2015	Date of analysis	12-04-2015

Sr No.	TESTS	SPECIFICATION	RESULT
1.	Description	White or almost white, crystalline powder.	Off white crystalline powder
2.	Solubility	Very slightly soluble in water, very soluble in methylene chloride and freely soluble in alcohol.	Complies.
3.	Identification a) By IR	IR spectrum of the sample should be concordant with that of the working standard.	Complies.
4.	Water content	NMT 0.3 %	0.09 %
5.	Sulphated ash	NMT 0.1 %	0.06 %
6.	Related Substances by HPLC	Impurity A: NMT 0.3 % Impurity B: NMT 0.3 % Impurity C: NMT 0.3 % Unspecified impurity: NMT 0.1 % Total impurity: NMT 1.0 %	0.01% ND 0.26 % 0.07% 0.48 %
7.	Assay by potentiometer	99.00 % to 101.00 % (on anhydrous basis)	99.85 %
8.	Residual solvent	Isopropyl alcohol NMT 5000 ppm Cyclohexane NMT 3300 ppm Toluene NMT 890 ppm	ND ND ND

The sample complies with the above-prescribed standards as per IP 2014.

Storage Condition: Store in tightly close containers and protect from light and moisture

	COMPILED BY	CHECKED BY	APPROVED BY
SIGN	<i>Febody</i>	[Redacted]	[Redacted]
DATE	19/08/2015	19/08/2015	15/08/2015



PRECISE

CIN U24110MH1923PTC075033



[Redacted Signature]
19/08/2015

www.precisegroup.co.in