

Estudio del control de crecimiento de *C. albicans* con sistemas de griseofulvina adsorbida en SiO₂-porosa obtenida de la cascara de arroz

Carmen Salazar-Hernández^{1*}, Ma. Mercedes Salazar-Hernández^{2*}, Higinio Juárez-Ríos¹, Martin Caudillo-González², Agustín H. Rocha²

Unidad Profesional Interdisciplinaria de Ingenierías¹, Departamento de Ingeniería en Minas, Metalurgia y Geología²
Instituto Politécnico Nacional¹, Universidad de Guanajuato²
Silao de la Victoria, Gto.¹; Guanajuato, Gto.²; México
msalazarh@ipn.mx, merce@ugto.mx

Abstract— This paper presents the synthesis and characterization of a mesoporous silica obtained from rice husk; This silica was used as a new carrier for griseofulvin (antifungal). This silica showed a maximum of 15% by weight of drug adsorption; Studies of adsorption and desorption of N₂ suggest silicas drug adsorption mostly goes into the pores of the material. The maximum rate of release of the drug adsorbed on the silica at pH 7 was 60%. Moreover, the study of drug - SiO₂ system in controlling the growth of *C. albicans* observing control of 90 % in the growth of the fungus for a maximum period of 6 h, with minimum dosages of 750 mg of SiO₂-drug corresponding to 112.5 mg of drug. Furthermore, a null pharmacological activity both griseofulvin and silica separately administered was observed. The results indicated that the SiO₂- rice can be an excellent carrier for griseofulvin.

Keyword— SiO₂-farmaco, biogenica, control, crecimiento, griseofulvina.

Resumen— El presente trabajo muestra la síntesis y caracterización de una sílice mesoporosa obtenida de la cascara de arroz; esta sílice fue empleada como un nuevo excipiente para la griseofulvina (antimicótico). Dicha sílice presentó un máximo del 15 % en peso de adsorción del fármaco; los estudios de adsorción y desorción de N₂ de las sílices sugieren que la adsorción del fármaco mayoritariamente va dentro de los poros del material. Por otra parte, se estudio del sistema SiO₂-farmaco en el control del crecimiento de *C. albicans* observando un control del 90 % en el crecimiento del hongo por un periodo máximo de 6 h, con dosificaciones mínimas de 750 mg de SiO₂-fármaco que corresponden a 112.5 mg de fármaco. Además, se observó una nula actividad farmacológica tanto por la griseofulvina y la sílice administradas por separado. Los resultados obtenidos indicaron que la SiO₂-arroz puede ser un excelente excipiente para la Griseofulvina.

Palabras claves— SiO₂-farmaco, biogenica, control, crecimiento, griseofulvina.

I. INTRODUCCIÓN

Desde hace algunos años con el desarrollo de la farmacéutica ha surgido la necesidad de diseñar acarreadores que permitan controlar la liberación de fármacos dentro del organismo; se puede decir que es tan importante el fármaco como lo es el sistema de administración de éste (excipiente). La principal función de los excipientes es llevar al fármaco donde es requerido tratando de evitar altas concentraciones en la sangre generadas por una mayor dosificación [1]. En la última década se han utilizado superficies mesoporosas de sílice con poros ordenados como acarreadores o sistemas de liberación continua de fármacos [2-10]. Algunos fármacos como el ibuprofeno [8], amoxicilina [3], itraconazol [7,8], naproxeno [11] entre otros han sido adsorbidos en estructuras de sílice mesoporosas ordenadas como la MCM-41 y SBA-15, en estos reportes se indica un buen funcionamiento de la sílice como excipientes para fármacos; este sólido inorgánico permite controlar las cinéticas de liberación de los fármacos como sistemas de liberación continua y prolongada.

Sin embargo, hasta la fecha la sílice empleada como excipiente de fármacos es obtenida a partir de la metodología del tamiz molecular [12-15] y no se ha explorado el comportamiento de una sílice

biogénica como lo es la obtenida de la cascarilla del arroz (SiO_2 -arroz) como posible excipiente para fármacos. Varios autores han reportado que para la obtención de la SiO_2 -arroz es necesario colocar la cascarilla del arroz (material de desecho) en lixiviación y finalmente calcinarla a temperaturas bajas entre 500-800°C [16,17].

Por otra parte, la aparición de infecciones micóticas se ha visto en aumento hoy en día y son más los pacientes en riesgo a desarrollar una infección de este tipo; esto en gran parte debido a las enfermedades como el cáncer, VIH, neoplasias malignas hematológicas, tratamientos inmunosupresivos, neutropenias prolongadas e inmunodeficiencias de células T. Estas enfermedades favorecen las infecciones micóticas debido a la baja de las defensas naturales en el ser humano que provocan el crecimiento de los hongos en el organismos. [18-23].

Entre las levaduras y hongos causantes de estas infecciones se encuentra los siguientes géneros: *Malassezia*, *Hortaea*, *Trichophyton*, *Microsporum*, *Cryptococcus*, *Rhizopus*, *Candida* [18-23]; de los cuales el género *Cryptococcus* y *Cándida* son los hongos oportunistas más frecuentemente aislados y relacionados a estas infecciones. La griseofulvina es un compuesto poco soluble que es recomendado únicamente para el tratamiento de tiñas; durante décadas ésta fue el único fármaco utilizado para el tratamiento de enfermedades causadas por los hongos queratinofílicos. Este fármaco actúa de forma fungostática limitándose a bloquear la reproducción del hongo ya que inhibe selectivamente el proceso de la mitosis. Para ello, se fija en una tubulina de los microtúbulos del huso mitótico actuando solo en los hongos en fase de reproducción [21-23].

Debido a que la griseofulvina no matan el microorganismo y solo impide su reproducción, el tratamiento debe prolongarse el tiempo suficiente para que permita el remplazo de todas las células epidérmicas con la eliminación completa de todos los microorganismos re-infectantes [23]. Por lo tanto, la dosificación de este fármaco debe realizarse en sistemas de dosificación controlada y prolongada como lo son los excipientes base sílice.

El presente trabajo muestra el estudio de la capacidad adsorción de la griseofulvina en una sílice biogénica (SiO_2 -arroz); así como la determinación de los parámetros fármacos cinéticos de liberación del fármaco adsorbido en la sílice a pH de 7. Finalmente, fue revisada la capacidad antifungistática del sistema SiO_2 -arroz-griseofulvina determinando la inhibición del crecimiento de cepas de *Cándida albicans* como caso de estudio.

II. EXPERIMENTACIÓN

Todos los reactivos utilizados en este trabajo, fueron grado reactivo de la casa comercial Sigma Aldrich. Las metodologías desarrolladas en este trabajo se muestran a continuación.

A. *Procedimientos Generales*

Los materiales utilizados fueron caracterizados por FT-IR empleando un espectrómetro Perkin Elmer modelo 100-Analyzer, en pastillas de KBr y ventana espectral de 4000-400 cm^{-1} , 4 cm^{-1} de resolución y 32 barridos. Los estudios de infrarrojo, permitieron confirmar la presencia del fármaco adsorbido en matriz. Las propiedades texturales de las muestras se estudiaron mediante los estudios de las isothermas de adsorción y desorción de N_2 , en un equipo Micrometric ASAP-2101. Las muestras fueron desgasificadas a 180 °C y 71 mmHg; el área superficial se determinó mediante el modelo de BET y la distribución del tamaño de poro mediante el modelo de BJH. La cantidad de fármaco

B. *Obtención de la SiO_2 -arroz (Sílice biogénica)*

La SiO_2 -arroz se obtuvo de acuerdo a la metodología descrita en la literatura de acuerdo a García-Vieyra y T. H. Liou [16, 17]. Esta metodología consiste en limpiar la cascara de arroz para eliminar los

desechos (polvo, tierra y basura). Posteriormente se llevó a cabo la pre-oxidación de la materia orgánica colocando 125 g de cascarilla limpia en 240mL agua regia, calentando hasta ebullición por 1 hr; posteriormente se dejó reposar por 12 h. Por último, la cascarilla tratada con agua regia se lavó y se dejó secar para calcinarse en atmósfera oxidante a 650°C por 2 h en un horno tubular Thermoscientific modelo F-21135 a una velocidad de calentamiento de 10 °C/min.

C. Adsorción de la Griseofulvina en SiO₂-arroz

Se colocó la SiO₂-arroz en una suspensión saturada de Griseofulvina (grado reactivo; Sigma-Aldrich) en agua destilada por 75 min. Posteriormente el polvo se filtró y se lavó con 5 porciones de 5 mL de isopropanol (grado reactivo)/agua destilada, 1:1 para eliminar el fármaco en la superficie de la sílice. Finalmente la sílice con el fármaco adsorbido (SiO₂-arroz-griseofulvina) fue secada a 80°C por 12 h.

D. Medio de propagación y preparación del inóculo de *Candida albicans*

Se utilizó como medio de propagación y conservación de la cepa, agar Sabouraud (BD-Dixon, 210700) y caldo Sabouraud, para preservar y propagar la levadura a 37°C [4]. Para llevar a cabo la preparación del inóculo, se tomaron colonias de *Candida albicans* a un tiempo de incubación de 24 horas en agar dextrosa Sabouraud y se activaron en caldo Sabouraud incubándolas a 30°C en matraces de 50 mL, que contenían 35 mL de caldo durante 24 horas (Incubadora Shel. Lab. Modelo 1555).

E. Cinética de crecimiento de *Candida albicans*.

Se prepararon 75 mL de medio líquido Sabouraud en matraces Erlenmeyer de 125 mL y se adicionó un volumen de inóculo de 1.0 mL (1 x10⁶- 5x10⁶ UFC/ mL). Posteriormente los matraces se mantuvieron en incubación a 36°C. Durante el desarrollo de la cinética, se tomaron muestras cada hora por un periodo de 12 h, que se usaron en la determinación de la concentración celular midiendo la absorbancia (densidad óptica) en un espectrofotómetro de UV-visible, cintra 6, a una longitud de onda máxima de 600 nm en celdas de cuarzo.

F. Estudio del efecto de la concentración de SiO₂ arroz- griseofulvina sobre el crecimiento.

Se prepararon 50 mL de medio de dextrosa Sabouraud, en matraces Erlenmeyer, estos fueron esterilizados a 121°C y 15 psi por 15 minutos. En condiciones asépticas se agregaron 0.25, 0.5, 0.75 y 1.0 g de SiO₂-arroz-griseofulvina, correspondientes a una dosis de 37.5, 75, 112.5 y 150 mg de fármaco respectivamente. Posteriormente el caldo fue inoculado con 1.0 mL de inóculo (~10⁶ células/ mL) excepto el control para cada caso e incubados a 36°C. Durante el desarrollo de la cinética, se tomaron muestras cada hora para la determinación de la concentración celular midiendo la absorbancia en un espectrofotómetro de UV- visible (Cintra 6) a una longitud de onda a 600 nm.

G. Determinación de células viables (UFC) y tiempo efectivo de liberación.

Una vez conocida la curva de crecimiento bajo las condiciones antes propuestas se inocularon 50 mL de caldo Dextrosa- Sabouraud con 1.0 mL de inóculo (~10⁶ células/ mL) y en la etapa exponencial a partir de la 4hr de crecimiento se agregaron 0.5 o 0.75 g de sílice arroz- griseofulvina adsorbida al 15% en peso y se tomaron muestras cada hora, para determinar el crecimiento por UV- visible y conteo de colonias en placas (UFC/mL). La determinación del UFC/ mL, se realizó tomando 1 mL de la muestra inicial (~10⁶ células/ mL) y se realizaron diluciones de 10², 10³ y 10⁴, a los tiempos de 5, 7, 9 y 11 h de crecimiento sin y con el sistema SiO₂-arroz-griseofulvina. Dichas diluciones se tomaron 10 mL y se inocularon en placas de agar Dextrosa- Sabouraud para determinar la cantidad de UFC/mL.

III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En esta sección, se exponen los resultados obtenidos en este proyecto, en donde se muestra una capacidad en el control del crecimiento de *C. albicans* de hasta un 90% con los sistemas SiO₂-arroz-griseofulvina.

A. Adsorción de la griseofulvina en la SiO₂-arroz

La caracterización por FTIR de la sílice biogénica (SiO₂-arroz) y la sílice adsorbida con la griseofulvina (SiO₂-arroz-griseofulvina) se muestra en la Figura 1, en donde se observa claramente la presencia de la materia orgánica en la sílice. Las señales correspondientes a las vibraciones: νC-H y δC-H se observaron a 2972-2870 y 1463-1353 cm⁻¹, así como las señales correspondientes a νC=C anillos aromáticos y νC=O se observan entre 1710-1505 cm⁻¹. Las vibraciones correspondientes a la red, νSi-O-Si, δSi-OH y δSi-O-Si se observan a 1091.3, 954.95 y 465.5 cm⁻¹ respectivamente para ambas sílices [24,25].

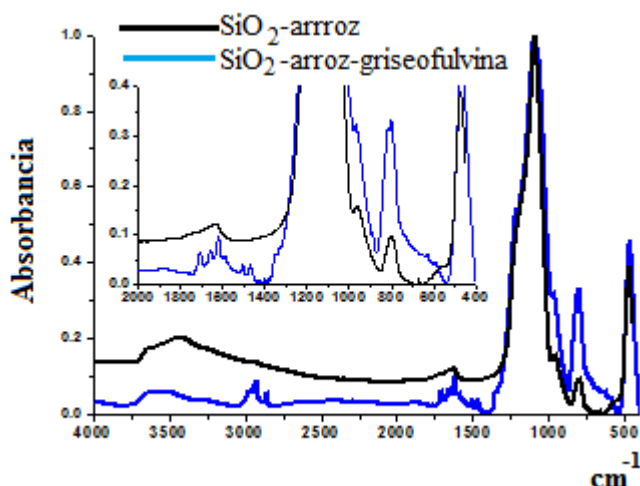


Fig. 1. Espectros de TIRF de la SiO₂-arroz y la SiO₂-arroz-griseofulvina.

Los estudios de adsorción-desorción de N₂ para ambas sílices se muestran en la Figura 2; ambos materiales presentaron isothermas tipo IV y un lazo de histéresis H3 de acuerdo a la clasificación de la IUPAC [26,27]. Los resultados obtenidos de las isothermas de adsorción-desorción de N₂ indicaron una disminución de la cantidad de volumen de nitrógeno adsorbido de 200 a 120 cm³/gr a la presión de saturación (P/P₀=1), lo cual ocurrió debido al llenado de los poros de la sílice con el fármaco.

La Figura 2b muestra la distribución de poros para la SiO₂-arroz y la SiO₂-arroz-griseofulvina, en esta gráfica se puede observar que en la sílice con la griseofulvina adsorbida presentan dos distribuciones de poro a 3.0 y 2.5 nm, mientras que el material original sólo presentaba una distribución a 4.77 nm. Estos resultados sugieren que el cierre de los poros por el fármaco adsorbido da lugar a dos distribuciones de poros conservando la forma cilíndrica (lazo de histéresis tipo H3). La Tabla 1 resume los valores promedio de área BET y volumen de poro determinado por el modelo BJH para ambas sílices (SiO₂-arroz y SiO₂-arroz-griseofulvina). Estos datos indican que el área superficial de la SiO₂-arroz, disminuye en un 42.9%, mientras que el volumen de poro decrece en un 39.33%.

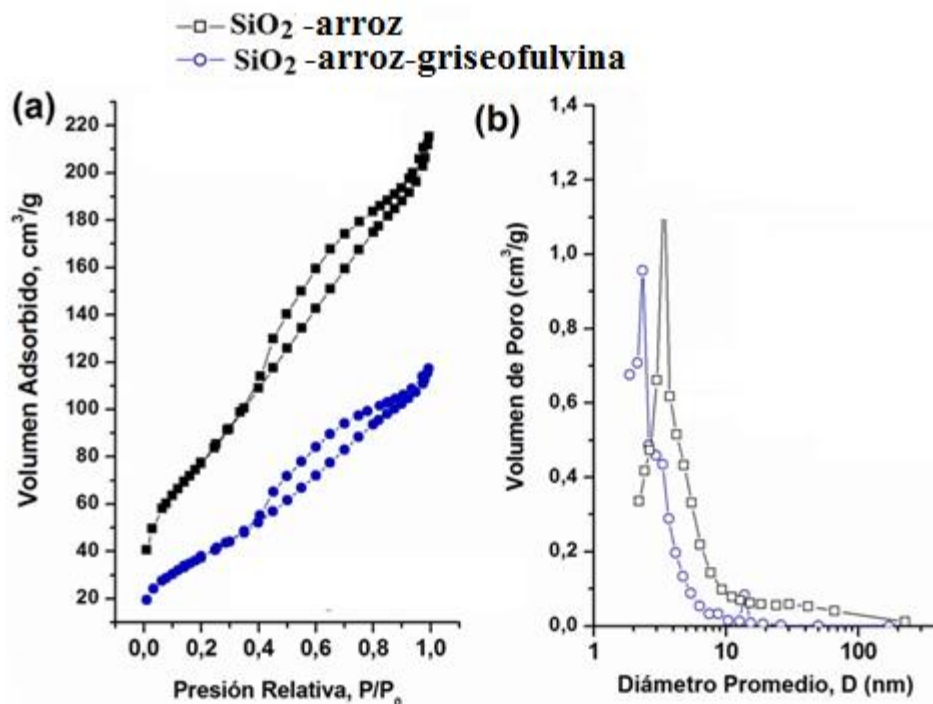


Fig. 2. Espectros de TIRF de la SiO₂-arroz y la SiO₂-arroz-griseofulvina.

Tabla I. Cambio de las Propiedades Texturales en la SiO₂-arroz y la SiO₂-arroz-griseofulvina.

	A _{BET} (m ² /g)	Vporo BJH (cm ³ /g)
SiO ₂ -arroz	243.71	0.2905
SiO ₂ -arroz-Griseofulvina	139.081	0.17622

B. Efecto del sistema SiO₂-arroz-griseofulvina en el crecimiento de C. albicans.

La Figura 3 muestra el efecto de la SiO₂-arroz y la griseofulvina en el crecimiento de *Candida albicans*; como puede observarse el crecimiento del microorganismo con el fármaco y la sílice son muy similares al del blanco (microorganismo en el medio de cultivo). Los resultados anteriores indican un nulo efecto del fármaco y la matriz silíceas sobre el crecimiento del hongo; lo cual muestra una biocompatibilidad de esta sílice con dicho microorganismo.

En la Figura 4 se puede observar el efecto del sistema SiO₂-arroz-griseofulvina (125 mg de fármaco) sobre el control del crecimiento de *C. albicans*; dichos resultados indicaron que la presencia del fármaco adsorbido en la sílice controló el crecimiento del hongo durante las primeras 6 horas del crecimiento; observándose en este periodo una prolongación de la fase de latencia. Lo anterior ocurre debido a que la sílice biogénica favoreció la interacción hongo-fármaco, ya que tanto el fármaco como la sílice por separado no ejercen control alguno en el crecimiento de *C. albicans* (Figura 3).

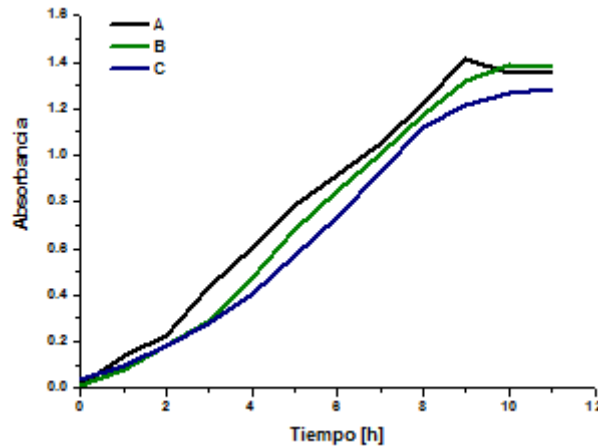


Fig. 3. Cinetica de crecimiento para *C. albicans*: A) Levadura; B) Levadura-SiO₂ –arroz (500mg) y C) Levadura-griseofulvina (125mg).

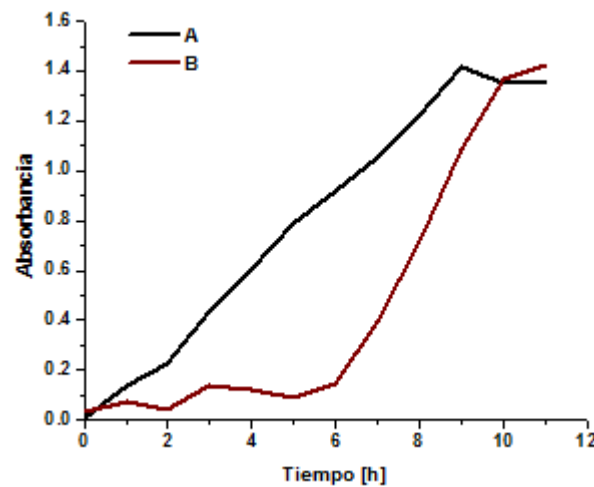


Fig. 4. Cinetica de crecimiento para *C. albicans*: A) Blanco y B) Levadura-SiO₂-arroz-griseofulvina(0.75 g; 112.5 mg de farmaco).

El efecto de la concentración del sistema SiO₂-arroz-griseofulvina en el crecimiento de *C. albicans* se estudió utilizando cuatro diferentes dosificaciones. Dichas dosificaciones fueron: 0.25, 0.50, 0.75 y 1.0 g del sistema SiO₂-arroz-griseofulvina, que corresponden a 37.5, 75, 112.5 y 150 mg del fármaco respectivamente en el sistema. En estos estudios se adición la SiO₂-arroz-griseofulvina media hora después de haber iniciado la inoculación (antes de la etapa exponencial, durante el periodo de latencia). La Figura 5, muestran los resultados obtenidos en este estudio; donde puede observarse que bajo una dosificación de 0.25 y 0.5 g de SiO₂-arroz-griseofulvina presentó alrededor del 37% de disminución en la biomasa (Figura 5a y b); mientras que las dosificaciones de 0.75 y 1 g del sistema disminuyó el crecimiento de la biomasa en un 85% durante las primeras 6 h de crecimiento (Fig. 5c y d). Estos

resultados indicaron que una dosificación mínima de 0.75 g del sistema SiO₂-arroz-griseofulvina (75 mg del fármaco) inhibe el crecimiento de *C. albicans* por periodos mínimo de seis horas.

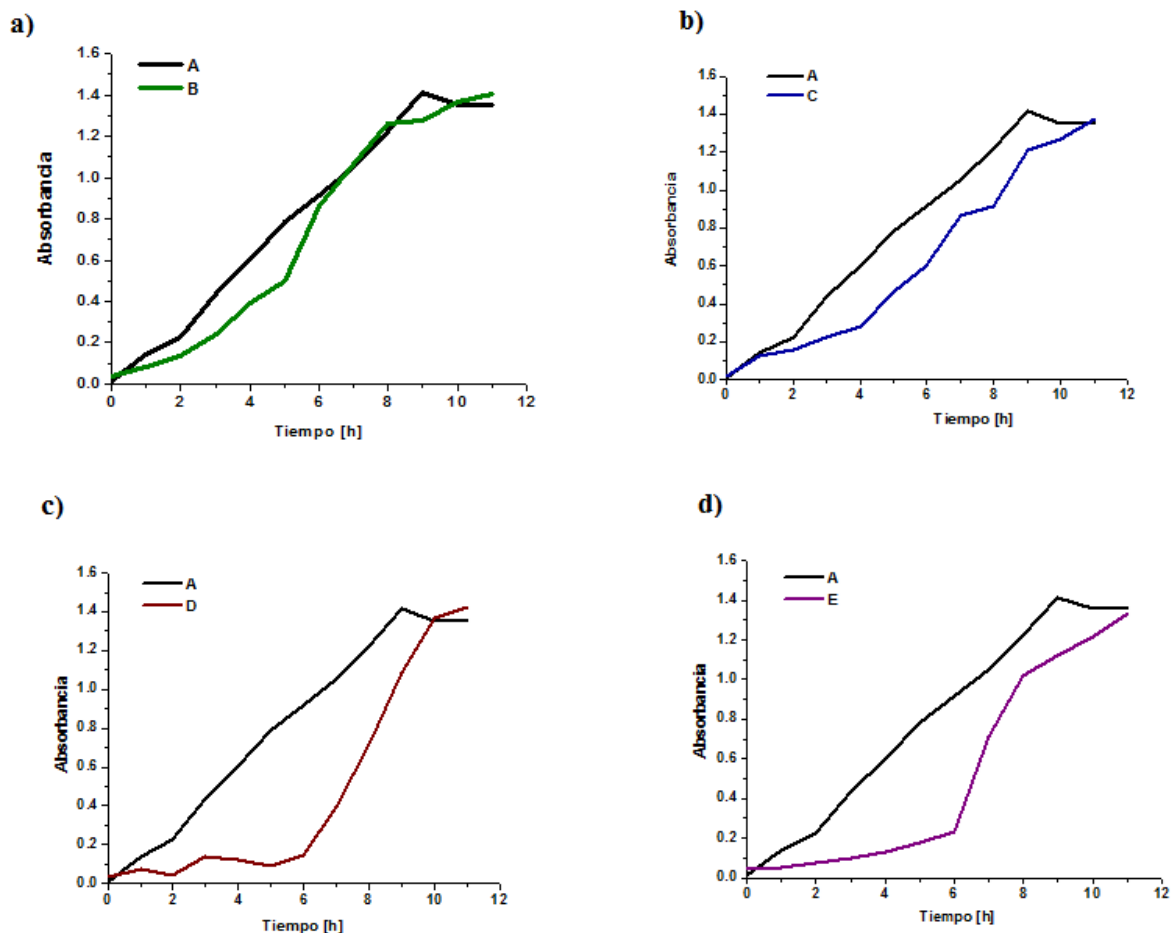


Fig. 5. Cinética de crecimiento para *C. albicans*: a) A: Blanco y B: SiO₂-arroz-griseofulvina(0.25 g; 37.5 mg de fármaco); b) A: Blanco y C: SiO₂-arroz-griseofulvina(0.5 g; 75 mg de fármaco); c) A: Blanco y D: SiO₂-arroz-griseofulvina(0.75g; 112.5mg de fármaco) y d) A: Blanco y E: SiO₂-arroz-griseofulvina(1 g; 150mg de fármaco).

La Figura 6 resume el efecto de la concentración SiO₂-arroz-griseofulvina en el control del crecimiento de *C. albicans* por periodos de 6h. Dosificaciones bajas (0.25 y 0.5 g de SiO₂-arroz-griseofulvina) permitieron un control del crecimiento del hongo inferior al 40 %; sin embargo, estas dosificaciones contienen únicamente 37.5 y 75 mg de griseofulvina. Por otra parte, se observó un control máximo del 85%, con dosificaciones de 0.75 y 1 g del sistema SiO₂-arroz-griseofulvina (112.5 y 150 mg de fármaco respectivamente). Todas las dosificaciones de fármaco proporcionadas por la sílice fueron menores a la dosificación comercial que es de 400 mg de fármaco; estos resultados indicaron que la adsorción del fármaco en la sílice favorece la biodisponibilidad de éste permitiendo la inhibición del crecimiento de *C. albicans* aun con concentraciones inferiores a la comercialmente utilizada.

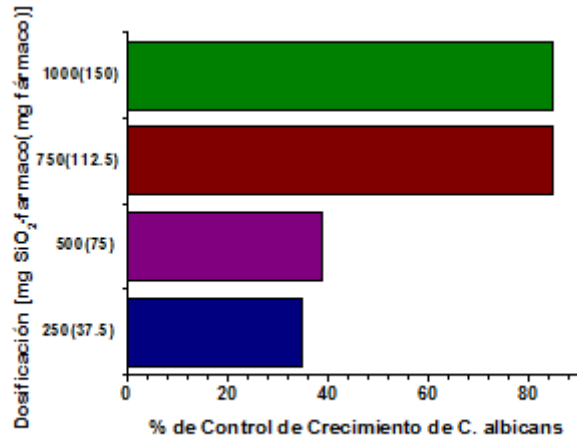


Fig. 6. Efecto de la concentración de SiO₂-arroz-griseofulvina en el control de crecimiento de C. albicans en caldo Sabouraud.

El efecto en el control del crecimiento de C. albicans por la SiO₂-arroz-griseofulvina en la etapa exponencial se muestra en la Figura 7, donde se indica la cantidad de unidades formadoras de colonias (UFC) contabilizadas después de realizar dosificaciones de 0.5 y 0.75 g del sistema sílice-fármaco (75 y 112.5 mg de fármaco respectivamente). Durante las primeras 5 hr se observó un control de crecimiento de prácticamente un 90 % para ambas dosificaciones; a la 7h la dosificación del 0.5 g de sílice-griseofulvina presentó un 28% de control en el crecimiento del hongo, mientras que la dosificación de 0.75 de sílice-fármaco obtuvo un 60% de control.

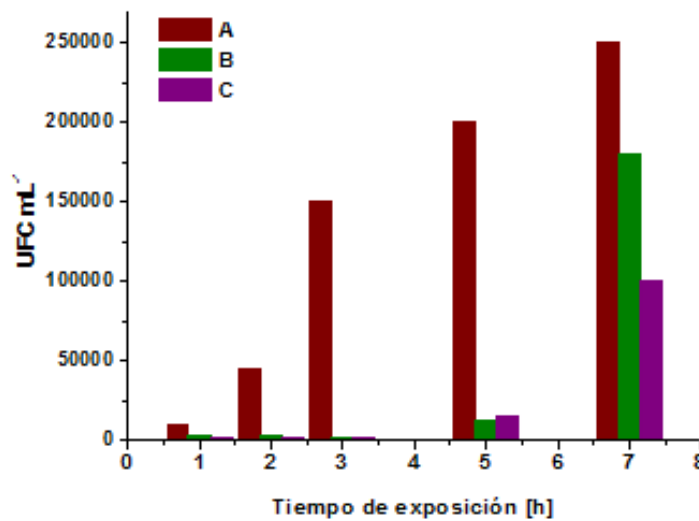


Fig. 7. UFC de C. albicans: A: Blanco, B: dosificación de 0.5 g de sílice-Fármaco (75 mg de fármaco) y C: dosificación de 0.75 g de sílice-fármaco (112.5 mg de fármaco).

IV. CONCLUSIONES

La griseofulvina adsorbida en sílice mesoporosa biogénica, obtenida de la cascara de arroz, permitió el control del crecimiento de *C. albicans*, aun no siendo este fármaco utilizado para el control de esta familia de hongos. La sílice permite la disponibilidad del fármaco, favoreciendo la actividad farmacológica de este. El sistema sílice-fármaco potencialmente podría ser utilizado para el tratamiento de candidosis interna, mostrándose un sistema biológicamente compatible y poco nocivo con capacidad de control de crecimiento de hasta un 90 % con cargas del fármaco muy inferiores a la comercial (36% de la dosis comercial).

AGRADECIMIENTOS

Los autores desean agradecer el apoyo económico otorgado por el Instituto Politécnico Nacional, mediante el proyecto SIP-20130874, para la elaboración de este trabajo, así como el soporte técnico de Carolina Nila Ríos.

REFERENCIAS

- [1] A. Boniofaz, M. A. Hernández, R. M. Ponce, "Antimicóticos" En Mendoza-Patiño N.(Eds.), Farmacología médica México: Medica Panamericana, 2008, pp.697-706.
- [2] S. Zhin-Guo, G. Qing- Zong, L. Yi-Ting, X. Yu-Xiu , X. Li "Drug delivery devices based on macroporous silica spheres", *Materials Chemistry and Physics*, 126, 2011, pp. 826-831.
- [3] F. Sevimli, A. Yilmaz, "Surface functionalization of SBA-15 particles for amoxicillin delivery", *Microporous and Mesoporous Materials*, 158, 2012, pp. 281-291.
- [4] M. Manzano, V. Aina, C.O. Arean, F. Balas, V. Cauda, M. Colilla, M.R. Delgado, M. Vallet-Regí, "Studies on MCM-41 mesoporous sílica for drug delivery: Effect of particle morphology and amine functionalization", *Chemical Engineering Journal*, 137, 2008, pp. 30-37.
- [5] Y.S. Lin, C.L. Haynes, "Impacts of mesoporous silica nanoparticle size, pore ordering and pore integrity on hemolytic activity", *J. Am. Chem. Soc.*, 132, 2010, pp. 4834-4842.
- [6] M. V. Speybroeck, V. Barillaro, T.D. Thi, R. Mellaerts, J. Martens, J.V. Humbeek, J. Vermant, P. Annaert, G.V.D. Mooter, P. Augustijns, "Ordered Mesoporous Silica Material SBA-15: a Broad-Spectrum Formulation Platform for Poorly soluble Drugs", *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 98(8), 2009, pp. 2648-2658.
- [7] R. Mellaerts, R. Mols, J.A.G. Jammaer, C.A. Aerts, P. Annaert, J.V. Humbeek, G.V. den Mooter, P. Augustijns, J.A. Martens, "Increasing the oral bioavailability of the poorly water soluble drug itraconazole with ordered mesoporous silica", *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 69, 2008, pp. 223-230.
- [8] R. Mellaerts, J. A.G. Jammaer, M.V. Speybroeck, H. Chen, J.V. Humbeek, P. Augustijns, G.V. den Mooter, J.A. Martens, "Physical state of poorly water soluble therapeutic molecules loaded into SBA-15 ordered mesoporous silica carriers: a case study with Itraconazole and Ibuprofen", *Langmuir*, 24, 2008, pp. 8651-8659.
- [9] Y. Zhang, J. Zang, T. Jiang, S. Wang, "Inclusion of the poorly water-soluble drug simvastatin in mesocellular foam nanoparticles: Drug loading and release properties", *International Journal of Pharmaceutics*, 410, 2011, pp. 118-124.
- [10] J. Zhang, X. Wang, T. Bai, Q. Jiang, S. Zhang, S. Wang, "Mesoporous silica nanoparticles for increasing the oral bioavailability and permeation of poorly water soluble drugs", *Molecular Pharmaceutics*, 9, 2012, pp. 505-513.
- [11] D. Halamová, M. Badanicová, V. Zelenak, T. A. Gondova, U. Vainio, "Naproxeno drug delivery using periodic mesoporous sílica SBA-15", *Applied Surface Science*, 256, 2010, pp. 6489-6494.

- [12] M.P. Mokhonoana, N.J. Coville, "Synthesis of [Si]-MCM-41 from TEOS and water glass: the water glass-enhanced condensation of TEOS under alkaline conditions", *J. Sol-Gel Sci Technol*, 54, 2010, pp. 83-92.
- [13] C. Gao, H. Qiu, W. Zeng, Y. Sakamoto, O. Terasaki, K. Sakamoto, Q. Chen, S. Che, "Formation Mechanism of Anionic Surfactant Templated Mesoporous Silica", *Chem. Mater*, 18, 2006, pp. 3904-3914.
- [14] A. Léonard, J.L. Blin, P.A. Jacobs, P. Grage, B.L. Su, "Chemistry of silica at different concentrations of non-ionic surfactant solutions: effect of pH of synthesis gel on the preparation of mesoporous silicas", *Microporous and Mesoporous Materials*, 63, 2003, pp. 59-73.
- [15] C. Gao, H. Qiu, W. Zeng, Y. Sakamoto, O. Terasaki, K. Sakamoto, Q. Chen, S. Che, "Formation mechanism of anionic surfactant templated mesoporous silica", *Chem. Mater.*, 18, 2006, pp. 3904-3914.
- [16] E. García-Vieyra, "Alcóxidos de sílicio a partir de sílice biogénica". Tesis para la obtención del grado de Licenciado en Química, Facultad de Química de la Universidad de Guanajuato (2007).
- [17] T.H. Liou, "Preparation and characterization of nano-structured silica from rice husk.", *Materials Science and Engineering A*, 364, 2004, pp. 313-323.
- [18] M. Velasco-Pastor, M. L. García-Melgares, E. Gimeno-Carpio, E. Roche Gamón, "Dermatofitosos en Vilata- Mocosis Cutáneas", Madrid: Médica Panamericana, 2006, pp. 49-67.
- [19] S. Margaret, L. Bellantoni, N. Konnikov., "Agentes antimicóticos orales, Dermatología en medicina general", En Wolff, Goldsmith, Katz, Gilcherest, Paller, Leffell Eds., Buenos Aires: Médica Panamericana, 2009, pp.2211-2217.
- [20] S. Forbes Weissself, "Diagnostico Microbiológico" Buenos Aires: Médica Panamericana, 2009, pp. 696-703.
- [21] F. Álvarez, C. Figueras, E. Roselló E "Infecciones fúngicas invasivas emergentes" Edit. *An Pediatric*, 73(1), Barcelona, 2010 ,pp. 52e1-52e4.
- [22] J.L. Folch-Mallol, A. Garay-Arroyo, F. Lledías, A. A. Covarrubias-Robles. "La respuesta a estrás en la levadura *Saccaromyces cerevisiae*". *Revista Latinoamericana de Microbiología*, 46(1-2), pp.24-46.
- [23] C.M. Hentzschel, M. Alnaief, I. Smirnova, A. Sakmann, C.S. Leopold, "Enhancement of griseofulvin release from liquisolid compacts" *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 80, 2012, pp. 130-135.
- [24] C. Salazar-Hernández, R. Zarrag, S. Alonso, S. Sugita, S. Calixto, J. Cervantes, "Effect os solvent type on polycondensation of TEOS catalyzed by DBTL as used for stone consolidation", *J Sol-Gel Sci Technol*, 49, 2009, pp. 301–310.
- [25] L.T. Zhuravlev; "The surface chemistry of amorphous silica. Zhuravlev model", *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 173, 2000, pp. 1–38
- [26] J. T. Barton, L. M. Bull, W. G. Klemperer, D. A. Loy, B. McEnaney, M. Misono, P. A. Monson, G. Pez, G. W. Scherer, J. C. Vartuli, O. M. Yaghi, "Tailored Porous Materials" *Chem. Mater.*, 11, 1999, pp. 2633-2656.
- [27] M. Kruk, M. Jaroniec "Gas Adsorption Characterization of Ordered Organic-Inorganic Nanocomposite Materials" *Chem. Mater.*, 13, 2001, pp. 3169-3183.