



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

SEDE BOGOTÁ  
FACULTAD DE CIENCIAS  
DEPARTAMENTO DE FARMACIA



**REVISTA COLOMBIANA  
DE CIENCIAS QUÍMICO-FARMACÉUTICAS**

Universidad Nacional de Colombia  
Facultad de Ciencias  
Departamento de Farmacia



Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm., Vol. 44(2), agosto 2015.

REVISTA COLOMBIANA DE CIENCIAS QUÍMICO-FARMACÉUTICAS

Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ciencias, Departamento de Farmacia.

ISSN 0034-7418, Fax: 3165060, A. A. 14490, Bogotá, D. C., Colombia.

Correo electrónico: rcciquifa\_fcbog@unal.edu.co.

Rector Universidad Nacional de Colombia: Ignacio Mantilla Prada, Ph. D.

Vicerrector sede Bogotá: Diego Hernández Losada, Ph. D.

Decano Facultad de Ciencias: Jesús Sigifredo Valencia Ríos, Ph. D.

Director Departamento de Farmacia: Jorge Ariel Martínez Ramírez, Esp., Ph. D. (C).

Directora Área curricular de Farmacia: Diana Marcela Aragón Novoa, Ph. D.

<http://www.farmacia.unal.edu.co/?itpad=182&niv=1&itact=182&ti=true&dep=4>.

Director-Editor Revista Colombiana de Ciencias Químico-Farmacéuticas:

Fleming Martínez R., Ph. D., Departamento de Farmacia, Facultad de Ciencias,

Universidad Nacional de Colombia, correo electrónico: fmartinezr@unal.edu.co.

Comité Científico:

*Alejandro Sosnik*, Ph. D., Department of Materials Science and Engineering, Technion, Israel Institute of Technology, Haifa, Israel.

*Carlos Bregni*, Ph. D., Departamento de Tecnología Farmacéutica, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires, Argentina.

*Juan M. Irujo*, Ph. D., Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica, Facultad de Farmacia, Universidad de Navarra, España.

*Mario F. Guerrero*, Ph. D., Departamento de Farmacia, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, D. C., Colombia.

*Mario G. de Carvalho*, Ph. D., Departamento de Farmácia, Instituto de Ciências Naturais, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Brasil.

*Martha R. Fontanilla*, Ph. D., Departamento de Farmacia, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, D. C., Colombia.

*Rubén H. Manzo*, Ph. D., Departamento de Farmacia, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba, Argentina.

*Victor Romanowski*, Ph. D., Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata, Argentina.

Comité Editorial:

*Abolghasem Jouyban*, Ph. D., Faculty of Pharmacy, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran.

*Álvaro F. Jiménez-Kairuz*, Ph. D., Departamento de Farmacia, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba, Argentina.

*Diego A. Chiappetta*, Ph. D., Departamento de Tecnología Farmacéutica, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires, Argentina.

*Fernão Castro Braga*, Ph. D., Departamento de Produtos Farmacêuticos, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brasil.

*María A. Peña*, Ph. D., Facultad de Farmacia, Universidad de Alcalá, Alcalá de Henares, Madrid, España.

*Marta Concheiro*, Ph. D., National Institute on Drug Abuse, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, U.S.A.

*Paulo R. de Oliveira*, Ph. D., Universidade Estadual do Centro-Oeste, Unicentro, Brasil.

Evaluadores:

*Alfredo Quevedo*, Ph. D., Departamento de Farmacia, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba, Argentina.

*Daniel Allemandi*, Ph. D., Departamento de Farmacia, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba, Argentina.

*Daniel R. Delgado*, Ph. D., Programa de Ingeniería Industrial, Facultad de Ingeniería, Universidad Cooperativa de Colombia, Neiva, Colombia.

*Debona Goncalves*, Ph. D., Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos SP, Brasil.

*Édgar F. Vargas*, Ph. D., Departamento de Química, Universidad de los Andes, Bogotá, D. C., Colombia.

*Marcela Moretton*, Ph. D., Departamento de Tecnología Farmacéutica, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires, Argentina.

*Fleming Martínez*, Ph. D., Departamento de Farmacia, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, D. C., Colombia.

*João Batista Lopes Martins*, Ph. D., Instituto de Química, Universidade de Brasília, Brasília D. F., Brasil.

*Jorge E. Hernández*, M. Sc., Ph. D. (C), Facultad de Ciencias, Universidad del Tolima, Ibagué, Colombia.

*José J. López, M. Sc.*, Ph. D. (C), Departamento de Farmacia, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, D. C., Colombia.

*María A. Peña*, Ph. D., Facultad de Farmacia, Universidad de Alcalá, Alcalá de Henares, Madrid, España.

*María M. Blanco*, Ph. D., Departamento de Química Orgánica, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires, Argentina.

*Maryam Hanzeh-Mivehroud*, Ph. D., Faculty of Pharmacy, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran.

*Silvia Lucangiolí*, Ph. D., Departamento de Tecnología Farmacéutica, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires, Argentina.

*Valeria Tripodi*, Ph. D., Departamento de Tecnología Farmacéutica, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires, Argentina.

Edición, corrección de estilo, armada electrónica e impresión: Proccitor Ltda., Bogotá. Teléfonos: 757 9200. Fax: ext. 102. [proccitor@yahoo.es](mailto:proccitor@yahoo.es).

La *Revista Colombiana de Ciencias Químico-Farmacéuticas* es un órgano de difusión en el cual se publican investigaciones científicas, comunicaciones técnicas y revisiones temáticas originales en las áreas de las Ciencias Farmacéuticas (véanse Normas para Publicación). La Revista está destinada principalmente a Químicos Farmacéuticos, Químicos, Ingenieros Químicos, Médicos Cirujanos, Médicos Veterinarios, y a otros profesionales de las ciencias físicas y naturales, de la ingeniería y de las profesiones sanitarias relacionadas con el uso de medicamentos.

La responsabilidad de lo expresado en cada artículo es exclusiva de los autores y no representa ni compromete posiciones de la Revista ni del cuerpo editorial. Los contenidos publicados pueden reproducirse siempre que se cite la fuente respectiva.

Amplia información acerca de la publicación, así como los contenidos de la totalidad de los números anteriores, se encuentran disponibles en el sitio <http://www.farmacia.unal.edu.co/?itpad=182&niv=1&itact=182&ti=true&dep=4>.

## Contenido

- Resultados del proceso productivo de la solución concentrada de propóleos 2010-2013. Impacto de la innovación tecnológica  
Luis Enrique Rodríguez Rodríguez, Walter Góngora Amores,  
Ariel Escalona Arias, Dailín Cobos Valdés, Saidé Batista Suárez,  
Carlos Loustanau Cárdenas, Armando Felipe González González 139
- O comportamento de paracetamol durante a sua oxidação eletrocatalítica sobre poli(azul da anilina) e a sua descrição matemática  
Volodymyr Tkach, Bahadurghatta Kumara Swamy,  
Reza Ojani, Olena Aksimentyeva, Jorge Zerbino, Petró Yagodynets,  
Ronald Mascarenhas 148
- Molecular docking study of naturally-occurring compounds as inhibitors of *N*-myristoyl transferase towards antifungal agents discovery  
Camilo Guerrero-Perilla, Freddy A. Bernal, Ericsson D. Coy-Barrera 162
- Uso indiscriminado de diclofenaco de potássio pela população idosa na cidade de Anápolis, no estado de Goiás, Brasil em 2014  
Rosa Silva Lima, Maria Jéssica Rocha Rodrigues,  
Thatiane Rodrigues da Silva, Celice Novais, Plinio Naves 179
- Microencapsulación de aceite esencial de tomillo (*Thymus vulgaris*) en matrices poliméricas de almidón de ñame (*Dioscorea rotundata*) modificado  
Germán Eduardo Matiz Melo, Katerin Fuentes López,  
Glicerio León Méndez 189
- Mecanismo de desempenho eletroanalítico da 2,7-bis(ferrocenil-etinil)-fluoreno-9-ona para eletrodetecção da hidrazina e sua descrição matemática  
Volodymyr V. Tkach, Somayeh Tajik, Reza Ojani, Michel O. G. Espínola,  
Montserrat Blanes, Petró I. Yagodynets, Márcia H. de Rizzo da Matta 208
- Solvatación preferencial de la naringina en mezclas cosolventes etanol + agua mediante el método de las integrales inversas de Kirkwood-Buff  
Diego Iván Caviedes Rubio, Reinaldo Gabriel Sotomayor Pino,  
Daniel Ricardo Delgado 220
- Estabilidad de gotas nasales de efedrina  
Niurka Benítez, Juan Manuel Cordoví, Reynerio Zamora,  
Pavel Cabrera, Nilia de la Paz, Mirna Fernández 236



## Resultados del proceso productivo de la solución concentrada de propóleos 2010-2013. Impacto de la innovación tecnológica

Luis Enrique Rodríguez Rodríguez<sup>1,4</sup>, Walter Góngora Amores<sup>2</sup>, Ariel Escalona Arias<sup>3</sup>, Dailín Cobos Valdés<sup>4</sup>, Saidé Batista Suárez<sup>5</sup>, Carlos Loustanau Cárdenas<sup>6</sup>, Armando Felipe González González<sup>7</sup>

<sup>1,2,3</sup> Departamento de Producción, Centro de Inmunología y Biopreparados (CIBHO), Av. de Los Álamos e/ Av. Lenin y Calle Mariana de la Torre, Holguín, Cuba.

Correos electrónicos: <sup>1</sup>luis@cibho.hlg.sld.cu, <sup>2</sup>wga@cibho.hlg.sld.cu, <sup>3</sup>ariel@cibho.hlg.sld.cu.

<sup>4</sup> Departamento de Investigaciones-Desarrollo, Centro de Inmunología y Biopreparados (CIBHO), Av. de Los Álamos e/ Av. Lenin y Calle Mariana de la Torre, Holguín, Cuba.

Correo electrónico: dailin@cibho.hlg.sld.cu.

<sup>5</sup> Departamento de Aseguramiento de la Calidad, Centro de Inmunología y Biopreparados (CIBHO), Av. de Los Álamos e/ Av. Lenin y Calle Mariana de la Torre, Holguín, Cuba.

Correo electrónico: saide@cibho.hlg.sld.cu.

<sup>6,7</sup> Departamento de Producción, Centro de Inmunología y Biopreparados (CIBHO), Av. de Los Álamos e/ Av. Lenin y Calle Mariana de la Torre, Holguín, Cuba.

Recibido para evaluación: 10 de junio de 2014.

Aceptado para publicación: 22 de abril de 2015.

### RESUMEN

El proceso productivo de las soluciones concentradas de propóleos en el Centro de Inmunología y Biopreparados, ha sido una tarea esencial desde el 2010; por consiguiente, el objetivo fundamental de este trabajo es mostrar cómo se han comportado los parámetros de calidad de los lotes de estas soluciones desde el 2010 al 2013, teniendo en cuenta los elementos de innovación tecnológica desarrollados. Se analizaron los requisitos de conformidad de las soluciones concentradas de propóleos, según los registros de control de la calidad para este producto. El procesamiento estadístico se realizó de forma automatizada con el programa estadístico Medcal. Las propiedades organolépticas de estas soluciones respondieron de forma positiva y las concentraciones de sólidos totales fueron superiores al 24%. Es importante señalar

que en los lotes obtenidos en 2012 y 2013, se logró un agotamiento significativo de la materia prima, debido a la introducción de cambios tecnológicos en el proceso; aspecto este que no afectó la calidad del producto, ya que los sólidos totales están por encima del 16% establecido en el Sistema de Gestión de Calidad del Centro, corroborándose los mismos con el análisis estadístico realizado. Se obtuvo un producto conforme y con calidad, lográndose una mejor recuperación de los principios activos de estas soluciones.

*Palabras clave:* propóleos, solución concentrada de propóleos, parámetros de calidad, sólidos totales, proceso de elaboración, innovación tecnológica.

## SUMMARY

### Results of the production process of the concentrated solution of propolis 2010-2013. Impact of technological innovation

The production process of Propolis Concentrated Solutions Center for Immunology and Biologicals, has been an essential task since 2010, so we have performed show how the parameters of quality of batches of these solutions from 2010 to 2013, is the main objective of this work taking into account the factors of technological innovation developed. Compliance requirements of Propolis Concentrated solutions were analyzed according to the records of Quality Control for this product. The statistical processing was performed automatically using the statistical program Medcal. The organoleptic properties of these solutions responded positively and total solids concentrations were higher than 24%, it is important to note that the lots obtained in 2012 and 2013, a significant depletion of the raw material was obtained, due to the introduction of technological changes in the process, appearance is not affected the quality of the product and the total solids are above the 16% set in the quality Management System of the center, corroborating them with statistical analysis. Conforming product quality and achieving a better recovery of the active ingredients of these solutions were obtained.

*Key words:* Propolis, propolis concentrated solutions, quality parameters, total solids, process development, technological innovation.

## INTRODUCCIÓN

El propóleos es un producto natural, resinoso de color rojo o amarillo verdoso, recogido por las abejas *Apis mellifera*, a partir de distintas fuentes vegetales. El propóleos es ampliamente utilizado en alimentos y bebidas, ya que mejora la salud humana. En este producto se encuentran más de 160 componentes identificados, constituyendo los compuestos fenólicos más del 50% de su peso total. La composición química y propiedades beneficiosas de propóleos varían mucho dependiendo de las áreas fitogeográficas, el tiempo de colecta, de temporada y la fuente botánica [1-5].

En los extractos de propóleos, el mínimo de materia seca permitida son 10 gramos cada 100 mililitros, mientras que de compuestos fenólicos y de flavonoides es de 0,25 gramos en 100 gramos. El máximo de cera permitido es de 2 gramos por 100 mililitros [6, 7].

Los propóleos exhiben un amplio espectro de propiedades, tales como antimicrobianos, antifúngica, antipsoriásico, analgésico, antioxidantes, antiinflamatorio, inmunomodulador, antitumoral, antiulceroso, hepatoprotector y presenta acciones neuroprotectoras [1, 8-16].

En un documento reciente, se realizó un estudio de optimización de las etapas de proceso de extracción, para la obtención de soluciones concentradas de propóleos (SCP), donde se demostró la factibilidad del mismo, gracias a los valores de los sólidos totales, volúmenes y rendimientos obtenidos [17].

Estudios realizados en Colombia con métodos similares de obtención de extractos secos de propóleos, a través de una maceración por 30 días, utilizando como solventes etanol al 70% y 90%, se obtuvieron sólidos solubles similares a lo reportado por las normas brasilera, japonesa y argentina con un 11%, 10% y 8%, respectivamente; resultados estos que están asociados fundamentalmente con el origen fitogeográfico, donde se desarrolló el propóleos utilizado [18, 19].

Como objetivo general de esta investigación, se expuso el comportamiento de los parámetros de calidad (propiedades organolépticas y sólidos totales) de las SCP, según lo establecido en el Sistema de Gestión de la Calidad (SGC) del Centro de Inmunología y Biopreparados de Holguín (CIBHO), en el período 2010-2013, teniendo en cuenta los cambios en el proceso de obtención del producto.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Teniendo en cuenta el objetivo trazado, se revisó la documentación registrada en el SGC de la entidad; para ello se analizaron los expedientes de cada uno de los lotes de la SCP elaborados desde el 2010 hasta el 2013.

Los parámetros de calidad a tener en cuenta para este estudio, se encuentran definidos en el procedimiento de Análisis físico-químico de propóleos, y la especificación: Solución alcohólica concentrada de propóleos del CIBHO.

Desde el punto de vista estadístico, se hizo un test de comparación de medias a las variables sólidos totales de todos los lotes producidos, como variable fundamental del estudio realizado antes del proceso de innovación y posterior al mismo, utilizando como herramienta el Software estadístico Medcal.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las SCP son obtenidas por diferentes técnicas de extracción. La tabla 1 muestra los valores de los parámetros de calidad de las SCP producidas en el 2010 y 2011 por la técnica de maceración con dos extracciones y un proceso de filtración y las producidas del 2012 al 2013 incorporando un tercer paso de extracción, un paso de incubación a temperatura controlada y una filtración a 4 °C, que representan la innovación tecnológica del proceso productivo de la SCP. Para la identificación de los lotes de SCP, se empleó la denominación de lotes establecida en el SGC de la entidad.

Al analizar las propiedades organolépticas se observan que todas se corresponden con la especificación del SGC implantado en el CIBHO, obteniéndose un líquido sin sedimentos, de color pardo rojizo oscuro, de olor resinoso, alcohólico y sabor amargo, para los lotes elaborados desde el 2010 hasta el 2013, lo que ratifica que la calidad del producto final cumple con la conformidad establecida y se mantuvo esta característica para el producto obtenido por el método tradicional y por el cambio propuesto. Sin embargo, en los lotes producidos con el cambio se observó una SCP más traslúcida y sin la presencia de cera.

Los sólidos totales de todos los lotes de SCP realizados cumplen con las especificaciones del SGC. Sin embargo, las producciones efectuadas en el 2010 y 2011, utilizando el proceso de extracción sin modificaciones tecnológicas, presentaron valores superiores a los lotes obtenidos en el 2012 y 2013 con la modificación.



Tabla 1. Parámetros de calidad de las SCP elaboradas desde 2010 hasta 2013.

Lotes de SCP	Propiedades organolépticas	Porcentaje de sólidos totales	Decisión final
<b>2010</b>			
F 100001	Responde	30,80%	Conforme
F 100002	Responde	36,50%	Conforme
F 100003	Responde	31,00%	Conforme
<b>Media</b>	-	<b>32,76%</b>	-
<b>2011</b>			
F 110001	Responde	35,00%	Conforme
F 110002	Responde	35,80%	Conforme
F 110003	Responde	33,20%	Conforme
<b>Promedio</b>	-	<b>34,66%</b>	-
<b>2012</b>			
F 120001	Responde	31,30%	Conforme
F 120002	Responde	30,50%	Conforme
F 120003	Responde	34,10%	Conforme
F 120004	Responde	29,40%	Conforme
F 120005	Responde	26,90%	Conforme
<b>Promedio</b>	-	<b>30,44%</b>	-
<b>2013</b>			
F 130001	Responde	24,00%	Conforme
F 130002	Responde	24,00%	Conforme
F 130003	Responde	23,00%	Conforme
F 130004	Responde	26,00%	Conforme
F 130005	Responde	25,55%	Conforme
F 130006	Responde	26,00%	Conforme
F 130007	Responde	23,20%	Conforme
F 130008	Responde	21,80%	Conforme
F 130009	Responde	25,05%	Conforme
<b>Promedio</b>	-	<b>24,72%</b>	-

Se debe señalar que esta disminución en los sólidos totales no implica que el producto obtenido disminuya su calidad, sino que representa que durante el proceso de

extracción, se agotó la materia bruta del propóleos para obtener un mayor rendimiento de principios activos, ya que estas SCP son destinadas a la elaboración de tinturas alcohólicas de 5% y 15%, requisito esencial para la obtención de estas producciones en los porcentajes indicados anteriormente.

Estos resultados se demostraron al realizar una comparación de las medias obtenidas para los sólidos totales entre los diferentes años. Se evidencia que existen diferencias significativas para un 95% de confianza al comparar los lotes correspondientes entre 2010 y 2013 y 2011 y 2012 (véanse anexos 1 y 2).

Sin embargo, al comparar las medias de los lotes de SCP del 2012 y 2013, obtenidas por el mismo método de extracción, existen diferencias mínimas y esto puede estar determinado por la calidad de la materia prima para la elaboración del producto, donde desempeñan un papel primordial los técnicos de control de la calidad en el proceso de inspección (véase anexo 3).

Si se comparan los resultados de este estudio con las normas internacionales y nacionales, se puede apreciar que aún se puede perfeccionar el proceso de elaboración de estas SCP introduciendo nuevos elementos a la innovación tecnológica, ya que los sólidos totales obtenidos en este trabajo, todavía son muy superiores al 11% establecido por estas normativas, aunque no se descarta la influencia de las características fitogeográficas y la época de recolección de la materia prima de propóleos.

Estos análisis corroboran que se pueden seguir ensayando otras variantes de obtención de SCP, con la finalidad de agotar aún más los principios activos presentes en la materia prima de propóleos; en el caso particular de la entidad, significaría disminuir el valor establecido en los requisitos de calidad del producto ( $\geq 16\%$ ).

Este trabajo clasifica como una innovación de proceso, debido a la introducción de un cambio tecnológico en la producción de la solución alcohólica concentrada de propóleos, que ha permitido mejorar su productividad, eficiencia y calidad.

## CONCLUSIONES

Se logró exponer la variación de los parámetros de calidad de las soluciones concentradas de propóleos obtenidas desde el 2010 hasta el 2013, producto de los cambios tecnológicos en el proceso productivo. Los cambios tecnológicos propuestos influyen positivamente en los parámetros de calidad de las soluciones concentradas de propóleos.

## REFERENCIAS

1. T. Farooqui, A.A. Farooqui, Beneficial effects of propolis on human health and neurological diseases, *Front. Biosci.*, **4**, 779-793 (2012).
2. G. Papotti, D. Bertelli, L. Bortolotti, M. Plessi, Chemical and functional characterization of Italian propolis obtained by different harvesting methods, *J. Agric. Food. Chem.*, **60**(11), 2852-2862 (2012).
3. M. Campos, "Estudio químico de propóleos cubanos", Tesis Doctoral, Instituto de Farmacia y Alimentos, Universidad de La Habana, 2008, pp. 9-19.
4. I. Márquez, "Análisis cromatográficos y espectroscópicos de propóleos cubanos", Tesis Doctoral, Instituto de Farmacia y Alimentos, Universidad de La Habana, 2007, pp. 28-31.
5. A.L. Piccinelli, M. Campo, O. Cuesta, I. Márquez, F. de Simone, L. Rastrelli, Isoflavonoids isolated from Cuban propolis, *J. Agric. Food. Chem.*, **53**(23), 9010-9016 (2005).
6. Normas IRAM-INTA, URL: [http://www.apicultura.entupc.com/nuestrarevista/nueva/notas/princ\\_estandar\\_propoleos.html](http://www.apicultura.entupc.com/nuestrarevista/nueva/notas/princ_estandar_propoleos.html). Consultado en enero de 2014.
7. Resolución conjunta 94/2008 y 357/2008, URL: <http://www.senasa.gov.ar/contenido.php?to=n&cin=1197&cio=7859>. Consultado en enero 2014.
8. A.A. Righi, T.R. Alves, G. Negri, L.M. Marques, H. Breyer, A. Salatino, Brazilian red propolis: Unreported substances, antioxidant and antimicrobial activities, *J. Sci. Food Agric.*, **91**(13), 2363-2370 (2011).
9. A. Pavilionis, A. Baranauskas, L. Puidokaite, Z. Mazeliene, A. Savickas, R. Radziūnas, Antimicrobial activity of soft and purified propolis extracts, *Medicina (Kaunas)*, **44**(12), 977-983 (2008).
10. A. Uzel, K. Sorkun, O. Onçağ, D. Cogulu, O. Gençay, B. Salih, Chemical compositions and antimicrobial activities of four different Anatolian propolis samples, *Microbiol. Res.*, **160**(2), 189-195 (2005).
11. A.M. Kurek-Górecka, A. Sobczakb, A. Rzepecka-Stojkod, M.T. Górecki, M. Wardas, K. Pawłowska-Góral, Antioxidant activity of ethanolic fractions of Polish propolis, *Z. Naturforsch C*, **67**(11-12), 545-550 (2012).

12. Propóleos, Medline Plus: Información de salud para usted. Servicio de la Biblioteca Nacional de EE. UU. Institutos Nacionales de la Salud, URL: <http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/spanish/druginfo/natural/390.html>. Consultado en enero de 2014.
13. N. Ledón, A. Casacó, R. González, N. Merino, A. González, Z. Tolón. Efectos antipsoriásico, antiinflamatorio y analgésico del propóleo rojo colectado en Cuba, *ZhongguoYaoliXuebao*, **18**(3), 274-276 (1997).
14. D. Suárez, “Estudio de la actividad antitumoral de propóleos cubanos”, Tesis de Maestría en Ciencias, Universidad de La Habana, 2003, pp. 45-56.
15. D. Sawicka, H. Car, M.H. Borawska, J. Nikliński, The anticancer activity of propolis, *Folia Histochem. Cytobiol.*, **50**(1), 25-37 (2012).
16. C. Lisbona, J. Díaz-Castro, M.J. Alférez, M.I. Guisado, R. Guisado, I. López-Aliaga, Positive influence of a natural product as propolis on antioxidant status and lipid peroxidation in senescent rats, *J. Physiol. Biochem.*, **69**(4), 919-925 (2013).
17. L.E. Rodríguez-Rodríguez, W. Góngora-Amores, A. Escalona-Arias, M.B. Miranda-Bazán, S. Batista-Suárez, Y. Bermúdez-Cisnero, Optimización de la extracción alcohólica para la obtención de soluciones concentradas de propóleos, *Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm.*, **44**(1), 47-57 (2015).
18. F.B.E. Alves, D. Guzmán, J. Figueroa, J. Tello, D. Oliveira, E. Días, Caracterización antimicrobiana y físico-química de propóleos de *Apis mellifera L* (Hymenoptera: Apidae) de la región andina colombiana, *Acta Biol. Colomb.*, **16**(1), 175-184 (2011).
19. C. Talero, D. Hernández, J. Figueroa, Calidad microbiológica de propóleos crudos y sólidos solubles de extractos de propóleos de *Apis mellifera* en Colombia, *Rev. Fac. Med. Vet. Zootec.*, **59**(2), 109-118 (2012).

## ANEXOS

Anexo 1. Comparación de las medias aritméticas entre los lotes obtenidos en el 2010 y 2013.

<b>Comparación de las medias aritméticas de los sólidos totales obtenidos de SCP (2010/2013)</b>	
Diferencia (Df)	8,48
Porcentaje de confianza	95%
<i>t</i>	6,510
<i>P</i>	0,0001

Nota: El valor calculado (Df) es mayor que el tabulado; por tanto, hay diferencia significativa para un 95% de confianza.

Anexo 2. Comparación de las medias aritméticas entre los lotes obtenidos entre 2011 y 2012.

<b>Comparación de las medias aritméticas de los sólidos totales obtenidos de SCP (2011/2012)</b>	
Diferencia (Df)	4,00
Porcentaje de confianza	95%
<i>t</i>	2,402
<i>P</i>	0,0532

Nota: El valor calculado (Df) es mayor que el tabulado; por consiguiente, hay diferencia significativa para un 95% de confianza.

Anexo 3. Comparación de las medias aritméticas entre los lotes obtenidos en el 2012 y 2013.

<b>Comparación de las medias aritméticas de los sólidos totales obtenidos de SCP (2012/2013)</b>	
Diferencia (Df)	5,72
Porcentaje de confianza	95%
<i>t</i>	5,312
<i>P</i>	0,0002

Nota: El valor calculado (Df) es mayor que el tabulado; por tanto, hay diferencia significativa para un 95% de confianza.

## O comportamento de paracetamol durante a sua oxidação eletrocatalítica sobre poli(azul da anilina) e a sua descrição matemática

Volodymyr Tkach<sup>1\*</sup>, Bahadurghatta Kumara Swamy<sup>2</sup>, Reza Ojani<sup>3</sup>, Olena Aksimentyeva<sup>4</sup>, Jorge Zerbino<sup>5</sup>, Petró Yagodynets<sup>1</sup>, Ronald Mascarenhas<sup>6</sup>

<sup>1</sup>Universidade Nacional de Chernivtsi, Ucrânia

\*E-mail: nightwatcher2401@gmail.com

<sup>2</sup>Universidade de Kuwempu, Índia

<sup>3</sup>Universidade de Mazandarã, República Islâmica do Irã

<sup>4</sup>Universidade Nacional de L'viv, Ucrânia

<sup>5</sup>Instituto de Investigações Físico-Químicas Teóricas e Aplicadas (INIFTA), Universidade Nacional de La Plata, República Argentina

<sup>6</sup>Instituto Indiano de Tecnologia, Bombaim, Índia

Recibido para evaluación: 29 de noviembre de 2014

Acceptado para publicación: 25 de abril de 2015

### RESUMO

A oxidação eletrocatalítica de paracetamol, acompanhada ou não pela eletropolimerização do próprio, sobre poli(azul da anilina) foi descrita matematicamente (usando a teoria de estabilidade linear e análise de bifurcações). Para o comportamento do composto foi sugerido o mecanismo que concorda com os dados experimentais e com os cálculos teóricos. Foi investigada também a dependência do desempenho do polímero e do comportamento do composto do pH.

*Palavras-chave:* paracetamol, poli(anilina azul), eletropolimerização, oscilações, estado estacionário estável.

## SUMMARY

### Paracetamol behavior during the electrocatalytic oxidation of poly (aniline blue) and its mathematical description

The electrocatalytic paracetamol oxidation over poly(aniline blue), accompanied or not by its electropolymerization, has been described mathematically (using the linear stability theory and bifurcation analysis). For the compound's behavior a mechanism, according with the experimental data and theoretical calculations, has been suggested. Also the pH-dependence of the work of the polymer and the compound's behavior has been investigated.

*Keywords:* paracetamol, poly(aniline blue), electropolymerization, oscillations, stable steady-state

## INTRODUÇÃO

Paracetamol (acetaminofeno ou N-acetil-p-aminofenol) é uma fenolamida acilada, introduzida por primeira vez por Von Mering em 1893, como um fármaco analgético efetivo para adultos e crianças. [1-2]. A sua ação no organismo consiste na inibição da síntese de prostaglandina no sistema nervoso central, o que tranquiliza o centro de calor e febre. No entanto, tem vários efeitos colaterais e o seu excesso no organismo pode causar a intoxicação do fígado e até a morte [3]. Por isso, o desenvolvimento de um método exato, preciso e sensível da análise das suas concentrações permanece sendo uma tarefa atual [4-7].

Além disso, tendo na sua composição uma hidroxila fenólica e um grupo imina (embora acilada), é um composto eletroquimicamente ativo [8-11], o que levou ao desenvolvimento dos procedimentos eletroanalíticos da sua detecção, Vale a pena mencionar também que paracetamol é um composto polimerizável [12-13], o que torna o seu comportamento eletroquímico ainda mais interessante do ponto de vista da obtenção de polímeros condutores (PC) com atividade biológica.

Por outro lado, azul da anilina (também chamada de azul da China e azul solúvel) é um corante aniônico, baseado em trifenilmetano, capaz da transferência intermolecular de carga [14]. Ele também pode ser indicador do pH.

O que dificulta a tarefa é o problema da detecção de um mecanismo mais provável da eletrooxidação de paracetamol (acompanhada ou não pela eletropolimerização), sobre

poli(azul da anilina) ou outro polímero condutor. No trabalho [15] o comportamento eletroquímico de paracetamol sobre poli (azul da anilina) foi descrito experimentalmente por meio dos métodos diferentes. Neste trabalho, continua-se a investigação da eletrooxidação do fármaco, sugerindo-se o mecanismo e acrescentando-se os cálculos teóricos, baseados no desenvolvimento e análise de um modelo matemático, capaz de descrever adequadamente os processos neste sistema. Esta modelagem, além de fornecer um mecanismo mais provável, não baseado apenas em deduções fenomenológicas, também dá a possibilidade de comparar o comportamento deste sistema com o dos semelhantes e, segundo o terceiro teorema de semelhança, descreve não só um sistema concreto, mas também os semelhantes.

Antes, foram feitas várias tentativas de descrever matematicamente os sistemas do desempenho de sensores e biossensores, baseados em polímeros condutores [17-27], ferroceno [28, 29], dióxido de titânio e nanopartículas do óxido de cobre (II) [30], bem como a eletrossíntese de polímeros condutores em condições diversas [31-41]. Este estudo, continuando a pesquisa, descrita nos trabalhos [15-42], aborda (na seção II), pela primeira vez, um sistema do comportamento eletroquímico de um sensor de um analito eletropolimerizável, o que é muito importante não só no contexto eletroanalítico de polímeros condutores, mas também no contexto da sua eletrossíntese. Na seção (I) será descrita a aplicação para o caso particular do sistema Paracetamol – Poli(azul da anilina) o modelo geral, descrito nos trabalhos [31-41].

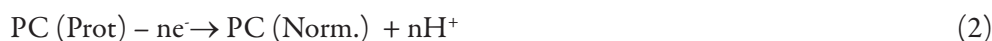
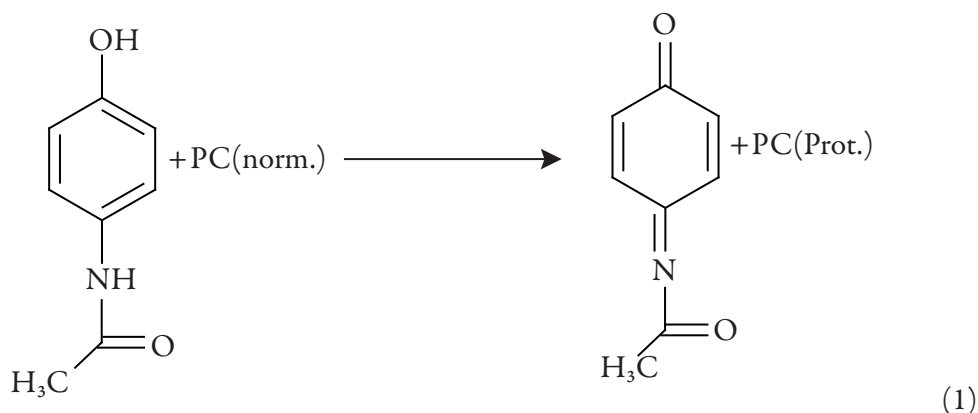
## SEÇÃO I. O DESEMPENHO ELETROANALÍTICO DA POLI(AZUL DA ANILINA) NA ELETROOXIDAÇÃO DE PARACETAMOL, NÃO ACOMPANHADA PELA ELETROPOLIMERIZAÇÃO

O comportamento químico e eletroquímico de paracetamol neste sistema depende do pH, haja vista a sensibilidade de ambos os compostos (paracetamol e polímero) contra os ataques protônicos e pode ser descrito mais ou menos de seguinte forma:

A oxidação que leva à aparição do polímero tem um mecanismo diferente e será descrita na seção (II).

Este mecanismo é um dos exemplos particulares do mecanismo geral que matematicamente já é descrito nos trabalhos [16-30]. Nesta seção, explicar-se-á o funcionamento dos modelos mencionados para este caso particular.





Como o desempenho eletroanalítico do PC, bem como o comportamento de paracetamol, depende do pH, introduzir-se-ão, nesta seção, as três variáveis:

- $c$  – a concentração de paracetamol na camada pré-superficial;
- $\theta$  – o grau de recobrimento da superfície pela forma protonada do PC;
- $h$  – a concentração dos prótons na camada pré-superficial.

Como nos artigos anteriores, a fim de simplificar a modelagem, supõe-se que o reator esteja agitando-se intensamente (para menosprezar o fluxo de convecção), que o eletrólito de suporte esteja em excesso (para menosprezar o fluxo de migração) e que o perfil concentracional na camada pré-superficial seja linear, sendo a espessura da camada constante e igual a  $\delta$ .

O paracetamol entra na camada pré-superficial por meio da sua difusão, é oxidado pelo polímero condutor e reage com os prótons. Posto assim, a sua equação de balanço descrever-se-á como:

$$\frac{dc}{dt} = \frac{2}{\delta} \left( \frac{\Delta}{\delta} (c_0 - c) - r_1 + H_1 \right) \quad (3)$$

Sendo  $\Delta$  o seu coeficiente de difusão,  $c_0$  a concentração de paracetamol no interior da solução,  $r_1$  a velocidade da reação (1).

O polímero condutor é protonado na reação (1) e a forma protonada é oxidada na reação (2), voltando o polímero para a forma inicial e liberando os prótons. Ele também pode ser protonado pelos prótons, presentes na solução. Destarte, a sua equação de balanço será descrita como:

$$\frac{d\theta}{dt} = \frac{1}{G}(r_1 + H_2 - r_2) \quad (4)$$

Sendo  $G$  a concentração máxima do polímero da azul da China na superfície,  $r_2$ , a velocidade da reação (2) e  $H_2$  a velocidade da reação da protonação direta da poli(azul da anilina).

Os prótons entram na camada pré-superficial por meio da sua difusão, e a sua concentração também aumenta durante a reação (2). A concentração dos prótons se diminui durante a protonação do analito e do polímero condutor. Assim sendo, a sua equação de balanço, neste sistema será descrita como:

$$\frac{db}{dt} = \frac{2}{\delta} \left( \frac{D}{\delta}(b_0 - b) + r_2 - H_1 - H_2 \right) \quad (5)$$

Sendo  $D$  o coeficiente de difusão dos prótons,  $b_0$  a concentração dos prótons no interior da solução.

As velocidades das reações podem ser descritas como:

$$r_1 = k_1 c(1 - \theta) r_2 = k_2 \theta \exp\left(\frac{zF\varphi_0}{RT}\right)$$

$$H_1 = k_{H1} b c H_2 = k_{H2} b(1 - \theta) \quad (6-9)$$

Sendo os parâmetros  $k$  as velocidades-padrão das respectivas reações,  $z$  o número de elétrons transferidos,  $F = NA^*e$  – o número de Faraday,  $\varphi_0$  o salto do potencial na dupla camada elétrica (DCE), relativo ao da carga zero,  $R$  a constante universal de gases e  $T$  a temperatura absoluta.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO (SEÇÃO I)

A fim de investigar matematicamente o comportamento eletroquímico e eletroanalítico do sistema paracetamol – poli(azul da anilina), analisamos o conjunto das equações diferenciais (3-5) por meio da teoria de estabilidade linear. A matriz fun-

cional de Jacobi, cujos elementos são calculados para o estado estacionário, pode ser descrita como:

$$\begin{pmatrix} a_{11} & a_{12} & a_{13} \\ a_{21} & a_{22} & a_{23} \\ a_{31} & a_{32} & a_{33} \end{pmatrix} \quad (10)$$

Sendo

$$a_{11} = \frac{2}{\delta} \left( -\frac{\Delta}{\delta} - k_1(1-\theta) - k_{H1}b \right) \quad a_{12} = \frac{2}{\delta} (k_1c) \quad a_{13} = \frac{2}{\delta} (-k_{H1}c)$$

$$a_{21} = \frac{1}{G} (-k_1(1-\theta))$$

$$a_{22} = \frac{1}{G} \left( -k_1c - k_{H2}b - k_2 \exp\left(\frac{zF\varphi_0}{RT}\right) * Wk_2\theta \exp\left(\frac{zF\varphi_0}{RT}\right) \right)$$

$$a_{23} = \frac{1}{G} (-k_1(1-\theta))$$

$$a_{31} = \frac{2}{\delta} (-k_{H1}b)$$

$$a_{32} = \frac{2}{\delta} \left( k_{H2}b - k_2 \exp\left(\frac{zF\varphi_0}{RT}\right) * Wk_2\theta \exp\left(\frac{zF\varphi_0}{RT}\right) - k_{H2}b \right)$$

$$a_{33} = \frac{2}{\delta} \left( -\frac{D}{\delta} - k_{H2}b(1-\theta) - k_{H1}c \right) \quad (11-19)$$

A *instabilidade oscilatória* pode ser realizada, neste sistema, nas condições da bifurcação de Hopf, para cuja satisfação é preciso (não sendo bastante) que na diagonal principal da matriz haja elementos positivos. O único elemento dela, capaz de sê-lo, é  $a_{22}$ , no caso da negatividade do parâmetro  $W$ , que descreve as influências fortes da reação eletroquímica na DCE. Esta causa do comportamento oscilatório é geral para todos os sistemas análogos [16-30].

A *estabilidade de estado estacionário*. Para simplificar a análise de Jacobiano, vamos introduzir as novas variáveis de modo que o seu determinante se reescreva como:

$$\frac{2}{\delta_2 G} = \begin{vmatrix} -\kappa_1 - \Lambda_1 - \Lambda_2 & \Phi_1 & X_1 \\ \Lambda_1 & -\Phi_1 - \xi_1 - \Phi_2 & X_2 \\ -\Lambda_2 & \xi_1 - \Phi_2 & -\kappa_2 - X_1 - X_2 \end{vmatrix} \quad (20)$$

Abrindo os parênteses, ver-se-á que a estabilidade do estado estacionário nesta reação é regida pela difusão do analito e dos prótons (altos valores dos parâmetros  $k$ , bem como pela saída mais rápida dos prótons da camada pré-superficial que a do monômero ( $\Lambda_2 > \Lambda_1$  ou ),

$$\begin{vmatrix} \Phi_1 & X_1 \\ \xi_1 - \Phi_2 & -\kappa_2 - X_1 - X_2 \end{vmatrix} > \begin{vmatrix} \xi_1 - \Phi_2 & -\kappa_2 - X_1 - X_2 \\ \Phi_1 & X_1 \end{vmatrix}$$

o que também está ligado à pior sensibilidade do sensor no meio fortemente ácido (junto com a difusão mais rápida dos prótons que do analito). Neste caso, a região de estabilidade de estado estacionário (e da sensibilidade do sensor e da manutenção da reação) é mais vasta que no caso do trabalho [42].

A condição de estabilidade do estado estacionário obter-se-á, resolvendo-se a inequação, saliente do critério de Routh e Hurwitz ( $\text{Det } J < 0$ ), relativamente, por exemplo, ao parâmetro da difusão do analito  $\kappa_1$ . Sob a forma de:

$$\kappa_1 > -\Lambda_1 - \Lambda_2 - Z \quad (21),$$

em que

$$Z = \frac{\Lambda_1(\xi_1 X_1 - X_1 \Phi_2 + k_2 \Phi_2 + X_1 \Phi_1 + X_2 \Phi_1) + \Lambda_1(X_2 \Phi_1 + X_1 \Phi_1 + \xi_1 X_1 + X_2 \Phi_1)}{\Phi_1 k_2 + \xi_1 k_2 + k_2 \Phi_2 + X_1 \Phi_1 + X_1 \xi_1 + X_1 \Phi_2 + X_2 \Phi_1 + 2X_2 \Phi_2}$$

Esta condição não se satisfaz no caso da negatividade de  $\xi_1$ , o que descreve as influências do processo eletroquímico na DCE, e no caso do valor negativo do coeficiente, adjacente ao parâmetro  $\Lambda_1$ , o que descreve o fator da influência do possível excesso dos prótons. Neste valor marginal, correspondente ao limite de estabilidade de estado estacionário, acontece a bifurcação estática (ou bifurcação de sela e nó), correspondente à instabilidade monotônica, cuja condição, para este sistema é:

$$\kappa_1 = > -\Lambda_1 - \Lambda_2 - Z \quad (22)$$

*Meio básico.* Como observamos anteriormente, o meio ácido faz o sensor menos sensível, haja vista a atividade dos prótons, pior impacto à estabilidade de estado estacionário

e a difusão mais rápida. Formar-se-ia, assim, a conclusão de que o pH alto favoreceria o desempenho eletroanalítico e eletrocatalítico do polímero condutor. No entanto, nos baixos valores do pOH as bases também são ativas (participando da dopagem do polímero condutor pela hidroxila, que altera a sua condutividade, reação com a hidroxila fenólica do analito, etc).

Sem embargo, como a base participa de menor número de reações com os componentes deste sistema, a curva “pico do parâmetro eletroquímico – pH” deve ter seu máximo no  $\text{pH}=\text{pOH}=7$ , ou seja, no meio neutro.

*Autocatálise.* Se, em vez de paracetamol, no sistema houver outro analito, cuja oxidação é autocatalítica, far-se-ão as observações, descritas em [16-30], sendo a autocatálise mais uma causa do comportamento oscilatório.

*A presença das substâncias interferentes.* O fator da presença das substâncias interferentes ao processo foi abordado no trabalho [17] e as suas observações continuarão vigentes para este caso.

## CONCLUSÕES (SEÇÃO I)

- 1) O mecanismo do desempenho da poli (azul da anilina) inclui a formação da forma quinônica, aliás, quinonimínica do analito e de fato a transferência dos prótons da molécula do paracetamol para o polímero condutor com a sua seguinte oxidação.
- 2) No meio fortemente ácido a protonação do polímero também pode ser realizada pelos prótons da solução.
- 3) A estabilidade do estado estacionário estável (e, em consequência, a reação) é controlada pela difusão do analito, e, no meio fortemente ácido, dos prótons. No meio fortemente ácido a velocidade sumária das reações dos prótons na camada pré-superficial deve ser menor que a do analito.
- 4) A instabilidade oscilatória para este sistema pode ocorrer, sendo causada pelas influências do processo eletroquímico na DCE.

- 5) A instabilidade monotônica tem a mesma causa, mas ocorre no ponto marginal do estado estacionário.

## SEÇÃO II. OXIDAÇÃO NORMAL, ACOMPANHADA PELA ELETROPOLIMERIZAÇÃO

Sendo substituída por um grupo ativador (-OH) e outro apassivador (-NHCOCH<sub>3</sub>), a molécula do paracetamol é polimerizável, sendo que o seu potencial de polimerização deve ser semelhante ao do benzeno.

A eletropolimerização se realiza conforme o mecanismo, análogo ao de Díaz[43-49], sendo que as unidades monoméricas se ligarão nas posições 2 e 6 (haja vista a orientação “concordante” da substituição eletrofílica), ou através do átomo de oxigênio fenólico. A eletropolimerização, neste caso, é precedida pela adsorção do monômero.

No caso da eletrooxidação de paracetamol sobre poli (azul da anilina), acompanhada pela sua eletropolimerização em meio neutro, introduzem-se as seguintes variáveis:

$c$  – a concentração de paracetamol na camada pré-superficial;

$\theta^*$  - o grau de recobrimento do paracetamol na superfície do polímero condutor;

$\theta$  – o grau do recobrimento da forma protonada da poli(azul da anilina),

supondo o suposto na seção I. Também supomos que a oxidação (1) do paracetamol acontece de forma mais efetiva na superfície que na solução.

O paracetamol entra na camada pré-superficial por meio da sua difusão, bem como por meio da dessorção. Sai da camada por meio da sua adsorção. Assim sendo, a sua equação de balanço será descrita como:

$$\frac{dc}{dt} = \frac{2}{\delta} \left( \frac{\Delta}{\delta} (c_0 - c) - r_1 + r_{-1} \right) \quad (23)$$

Sendo  $r_1$  e  $r_{-1}$  as velocidades de adsorção e dessorção do analito-monômero.

O analito (e monômero ao mesmo tempo) entra na superfície polimérica por meio da adsorção, saindo dela por meio da dessorção. Ele é oxidado formando composto quinônico (1) e polimerizado. Posto assim, a sua equação de balanço descrever-se-á como:

$$\frac{d\theta^*}{dt} = \frac{1}{G} (r_1 - r_{-1} - r_2 - r_3) \quad (24)$$

Sendo  $r_3$  a velocidade da eletropolimerização.

A forma protonada da poli(azul da China) aparece na superfície no processo da oxidação de paracetamol, bem como na sua polimerização (pois os prótons, subprodutos da eletropolimerização, entram na matriz do polímero do corante). Oxidando-se o polímero volta ao estado inicial. Destarte, a sua equação de balanço será

$$\frac{d\theta}{dt} = \frac{1}{G}(r_2 + r_3 - r_4) \quad (25)$$

sendo  $r_4$  a velocidade da eletrooxidação da forma protonada do polímero.

As velocidades dos respectivos processos podem ser descritas como:

$$r_1 = k_1 \exp(a(\theta^*))c(1-\theta^*) \quad (26)$$

$$r_1 = k_1 \exp(-a\theta^*)\theta^* \quad (27)$$

$$r_2 = k_2\theta^*(1-\theta) \quad (28)$$

$$v_3 = k_3\theta^*(1-\theta)\exp\left(\frac{z_1 F}{RT}\phi_0\right) \quad (29)$$

$$r_4 = k_4\theta\exp\left(\frac{z_1 F\phi_0}{RT}\phi_0\right) \quad (30)$$

## RESULTADOS E DISCUSSÃO (SEÇÃO II)

Usando, para o sistema de equações (23-25) o procedimento, anteriormente descrito e introduzindo as novas variáveis, para simplificar a análise de Jacobiano, obtê-lo-emos sob a forma de:

$$\frac{2}{\delta G_1 G_2} \begin{vmatrix} -k - \Omega_1 & \Sigma_1 & 0 \\ \Omega_1 & -\Sigma_1 - \Sigma_2 & \Theta_1 \\ 0 & \Sigma_2 & \Theta_1 - \Theta_2 \end{vmatrix} \quad (31)$$

O comportamento oscilatório para este sistema, bem como para todos os sistemas com a eletropolimerização e com o desempenho eletroanalítico de polímeros condutores é possível (experimentalmente foi observado em [46-49], sendo causado pela interação atrativa entre partículas adsorvidas de paracetamol (positividade do elemento  $-\Sigma_1$ , através da positividade do parâmetro da interação  $a_1$ ) e pelas influências dos processos eletroquímicos (eletropolimerização e eletrooxidação) na DCE (positividade de  $-\Sigma_2$  e de  $\Theta_2$ ).

*A estabilidade do estado estacionário:* Introduzindo, segundo o critério de Routh e Hurwitz, a inequação  $\text{Det } J < 0$  e abrindo os colchetes, vê-se que, no caso da interação repelente entre as partículas adsorvidas e ausência das influências das reações eletroquímicas na DCE (positividade de  $\Sigma_1$ ,  $\Sigma_2$  e  $\Theta_2$ ), introduz-se o estado estacionário estável, regulado, neste caso, pela difusão do paracetamol. A condição de estabilidade do estado estacionário (sendo a inequação resolvida relativamente ao parâmetro de difusão  $\kappa$ ), descrever-se-á como:

$$-k < \frac{\Omega_1 \Sigma_2 \Theta_2}{\Sigma_1 \Theta_1 + \Sigma_1 \Theta_2 + \Sigma_2 \Theta_2} \quad (32)$$

Satisfazendo-se os requisitos mencionados, a condição (32) se satisfaz sempre, o que define a instalação rápida e duradoura do estado estacionário estável. Na margem de estabilidade, como no caso anterior, realiza-se a instabilidade monotônica.

A eletropolimerização não é favorável para fins eletroanalíticos. Sem embargo, as condições da sua realização com impacto grande, são para mais além do potencial de trabalho e(ou) dos valores concentracionais do sensor.

## CONCLUSÕES (SEÇÃO II)

- 1) O comportamento do sistema com a eletrooxidação catalítica do paracetamol, acompanhado pela sua eletropolimerização, tende à formação do estado estacionário estável, controlado pela difusão e garantido pela interação repelente das partículas adsorvidas e pela ausência das influências na dupla camada elétrica.
- 2) As estruturas dissipativas temporais para este sistema, bem como para os semelhantes, existem, sendo mantidas pela difusão do monômero e formação do polímero. As causas do comportamento oscilatório são análogas às doutros casos da eletropolimerização e desempenho eletroanalítico de polímeros condutores.



## REFERÊNCIAS

1. S. Mehretie, S. Admassie, M. Tessema, T. Solomon, *Anal. Bioanal. Electrochem.*, **3**, 38 (2011).
2. N.R. Goyal, V.K. Gupta, M. Oyama, N. Bachheti, *Electrochem. Comm.*, **7**, 803 (2005).
3. M.J. Hodjmann, A.R. Garrard, *Crit. Care Clin.*, **28**, 499 (2012).
4. A.R. Solangi, S.Q. Memon, A. Mallah *et al.*, *Pak. J. Pharm. Sci.*, **24**, 539 (2011).
5. S. Zhao, W. Bai, H. Yuan, D. Xiao, *Anal. Chem. Acta*, **559**, 195 (2006).
6. O. Calinescu, I. Badea, L. Vladescu *et al.*, *J. Chromat. Sci.*, **50**, 335 (2012).
7. A. Pyka, M. Budzisz, M. Dolowy, *BioMed Res. J.*, N. 545703 (2013).
8. L. Ozcan, Y. Sahin, *Sens. Act. B. Chem.*, **2**, 362 (2007).
9. S. Shahrorkhian, R. Saberi, *Int. J. Electrochem.*, N.764294 (2011).
10. F. Yang, J. Liu, H. Ting, Q. Zhang, *Coll. Surf. B.*, **85**, 289 (2011)
11. Y. Peng, Z. Wu, L. Zhigang, *Anal. Met.*, **6**, 5673 (2014).
12. J. Van Steveninck, J.F. Koster, T. Dubbelman, *Biochem. J.*, **259**, 633 (1989).
13. Y. Li, Sh. M. Chen, *Int. J. Electrochem.*, **7**, 2175 (2012).
14. C.Y. Ying, Y. Liu, D. Zheng *et al.*, *J. Photochem. Photobiol.*, **188**, 51 (2007).
15. C.C. Vishwanath, B. Kumara Swamy, *Anal. Bioanal. Electrochem.*, **6**, 573 (2014).
16. V. Tkach, V. Nechyporuk, P. Yagodynets', *Anal. Bioanal. Electrochem.*, **6**, 273 (2014).
17. V. Tkach, V. Nechyporuk, P. Yagodynets', *Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm.*, **42**, 215 (2013).
18. V. Tkach, V. Nechyporuk, P. Yagodynets', I. Rusnak, *Orbital Elec. J. Chem.*, **4**, 136 (2012).

19. V. Tkach, V. Nechyporuk, P. Yagodynets, *Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm.*, **42**, 30 (2013).
20. V. Tkach, V. Nechyporuk, P. Yagodynets', *Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm.*, **41**, 203 (2012).
21. V. Tkach, V. Nechyporuk, P. Yagodynets', Yu. Meslyuk, *Rev. Soc. Quím. Perú*, **77**, 259 (2011).
22. V. Tkach, G. Maia, S.C. de Oliveira, R. Ansari, R. Ojani, P. Yagodynets', Anais do 7º Encontro Nacional de Tecnologia Química, Vitória, ES, Brasil, 17 a 19 de Setembro de 2014.
23. V. Tkach, V. Nechyporuk, P. Yagodynets', III Encontro em Técnicas de Caracterização em Análise Química, 6 de junho de 2014, Braga, Portugal, p. 73.
24. V. Tkach, B. Kumara Swamy, R. Ojani, M. Blanes, P. Yagodynets', *Orbital Elec. J. Chem.*, **7**, 1 (2015).
25. V. Tkach, V. Nechyporuk, P. Yagodynets', Proceedings of the 1st CQM Annual Meeting and the 9<sup>th</sup> Materials' Group Meeting of the University of Madeira, 31<sup>st</sup> of January – 1<sup>st</sup> of February 2014, Funchal, Região Autónoma da Madeira, Portugal, p. 37.
26. V. Tkach, V. Nechyporuk, R. Ojani, P. Yagodynets', M. Tazyrov, Anales del XXX Congreso Argentino de Química, 22 al 24 de Octubre de 2014, Buenos Aires, URL: <http://aqa.org.ar/pdf101/cd/Qca.Analitica/1-001.pdf>, acessado aos 17 de novembro de 2014.
27. V. Tkach, R. Ojani, V. Nechyporuk, P. Yagodynets', M. Tazyrov, Libro del XXVII Congreso Nacional de Química Analítica, 25 al 27 de junio de 2014, Puebla, México, p. 56.
28. V. Tkach, R. Ojani, V. Nechyporuk, P. Yagodynets, *Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm.*, **43**, 35(2014).
29. V. Tkach, R. Ojani, V. Nechyporuk, P. Yagodynets', III Encontro em Técnicas de Caracterização em Análise Química, 6 de junho de 2014, Braga, Portugal, p. 72.
30. V. Tkach, R. Ojani, V. Nechyporuk, P. Yagodynets', *Orbital. Elec. J. Chem.*, **6**, 142 (2014).
31. V. Tkach, V. Nechyporuk, P. Yagodynets', *Cienc. Tecn. Mat.*, **24**, 54 (2012).

32. V. Tkach, V. Nechyporuk, P. Yagodynets', *Proc. Quím.*, **8**, 49 (2014).
33. V. Tkach, V. Nechyporuk, P. Yagodynets', M. Hryhoryak, *Cienc. Tecn. Mat.*, **24**, 50 (2012).
34. V. Tkach, V. Nechyporuk, P. Yagodynets', *Tecn. Met. Mat. Min.*, **10**, 249 (2013).
35. V. Tkach, V. Nechyporuk, P. Yagodynets', *Avan. Quím.*, **8**, 9 (2013).
36. V. Tkach, V. Nechyporuk, P. Yagodynets', *Avan. Quím.*, **8**, 97 (2013).
37. V. Tkach, V. Nechyporuk, P. Yagodynets', *Afinidad*, **70**, 73 (2013).
38. V. Tkach, V. Nechiporuk, P. Yagodinets, S.C. de Oliveira, A. M. da Rocha, *J. Sib. Fed. Univ. Chem.*, **7**, 403(2014).
39. V. Tkach, V. Nechyporuk, P. Yagodynets', Anais do 10o Encontro Brasileiro sobre Adsorção, Guarujá, SP, 27-30 de abril de 2014, N. 122-1
40. V. Tkach, V. Nechyporuk, P. Yagodynets', *Med. J. Chem.*, **3**, 1122 (2015).
41. V. Tkach, V. Nechyporuk, P. Yagodynets', 3rd Portuguese Young Chemists' Meeting, Porto, 9-11 of May, 2012, p. 176.
42. S.E. Baghbamidi, H. Beitollahi, S. Tajik, *Anal. Bioanal. Electrochem.*, **6**, 634 (2014).
43. S. Sadki, Ph. Scotland, N. Brodie, G. Saboraud, *Chem. Soc. Rev.*, **29**, 283 (2000).
44. O.I. Aksimentyeva, "Physico-chemical regulaments of obtaining and properties of conducting polymers in thin films" (in Ukranian), Sc. D. Thesis in Physical Chemistry, National University of Chernivtsi, 2000.
45. J. Roncali, *Chem. Rev.*, **92**, 711 (1992).
46. I. Das, N. R. Agrawal, S. A. Ansari, S. K. Gupta, *Ind. J. Chem.*, **47A**, 1798 (2008).
47. M.S. Ba-Shammakh, "Electropolymerization of pyrrole on mild steel for corrosion protection", Ph. D. Thesis, King Fahd University of Petroleum and Minerals, Dharan, Saudi Arabia, 2003.
48. D. Sazou, *Synth. Met.*, **130**, 45 (2002).
49. K.R. Lemos-Castagno, "Eletropolimerização de pirrol sobre liga de alumínio 1100", Tés. D. Sc., Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2007.

## Molecular docking study of naturally-occurring compounds as inhibitors of *N*-myristoyl transferase towards antifungal agents discovery

Camilo Guerrero-Perilla, Freddy A. Bernal, Ericsson D. Coy-Barrera\*

Laboratorio de Química Bioorgánica, InQuiBio, Departamento de Química, Facultad de Ciencias Básicas y Aplicadas, Universidad Militar Nueva Granada, Cundinamarca, Colombia. A. A.: 49300. Fax: +57 1 2147280.

\*Correo electrónico: ericsson.coy@unimilitar.edu.co.

Recibido para evaluación: 20 de enero de 2015.

Aceptado para publicación: 5 de mayo de 2015.

### SUMMARY

Fungal infections currently remain as a common problem in public health. Actually, drug discovery programs are oriented to the searching for lead structures. Virtual screening and molecular docking constitute great alternatives in order to find hit compounds. Novel infection targets can also be defined and employed together with molecular docking tools in drug discovery programs. Thus, thirty-two natural compounds were docked within the active site of *N*-myristoyl transferase (NMT) as antifungal enzyme target. From tested compounds, alkaloids, flavonoids, xanthenes, and quinones exhibited strongest mean interaction with NMT than terpenoids, coumarins and phenolics. Particularly, affinities for one aporphine alkaloid, a prenylated flavonoid and two xanthenes resulted to be comparable with that of previously reported synthetic inhibitor. Several hydrophobic and polar contacts were demonstrated by comparing different computational tools. The present results let to establish three possible lead structures to develop antifungal drugs although subsequent SAR analyses are still required.

*Key words:* Molecular docking, natural products, antifungal, *N*-myristoyl transferase.

## RESUMEN

### Acoplamiento molecular de compuestos de origen natural como inhibidores de la *N*-miristoil transferasa en el descubrimiento de nuevos agentes antifúngicos

Las infecciones causadas por hongos continúan siendo un problema de salud pública en la actualidad. De hecho, existen diversos programas para el descubrimiento de fármacos enfocados en la búsqueda de estructuras plantilla. El mapeo virtual junto con *docking* molecular constituye una alternativa importante para encontrar potenciales estructuras promisorias. Mediante herramientas de *docking* molecular se pueden definir nuevos blancos terapéuticos para combatir diversas infecciones. Por tanto, se llevó a cabo el estudio del acoplamiento molecular a treinta y dos compuestos de origen natural, empleando la *N*-miristoil transferasa (NMT) como blanco enzimático antifúngico. De los compuestos ensayados, alcaloides, flavonoides, xantonas y quinonas mostraron interacción media más fuerte con la NMT que los terpenos, cumarinas y fenólicos. Particularmente, la afinidad encontrada para un alcaloide aporfínico, un flavonoide prenilado y dos xantonas resultó comparable con la encontrada para un inhibidor sintético reportado. En el presente trabajo se demostraron varias interacciones tanto hidrofóbicas como hidrofílicas mediante diversas herramientas computacionales. Los resultados encontrados permiten establecer tres posibles estructuras promisorias para el desarrollo de fármacos antifúngicos, aunque se requiere aún de estudios de relación estructura-actividad.

*Palabras clave:* *docking* molecular, productos naturales, antifúngicos, *N*-miristoil transferasa.

## INTRODUCTION

So far, fungal infections remain being a public health problem. The use of antimicrobial drugs always carries the risk that resistance appears due to adaptable nature of the microorganism populations [1]. At this regard, continuous searching for antifungal agents on new targets or new action mechanisms is still required. Systemic antifungal agents can be generally grouped on basis of their action mechanism in pathogenic fungi, mainly in cell membrane, cell wall and intracellular action [2]. In depth, eight targets have been defined for antifungal therapy as follows: fungal ergosterol synthesis inhibitors, squalene epoxidase inhibitors, ergosterol disruptors, glucan synthesis inhi-

bitors, chitin synthesis inhibitors, nucleic acid synthesis inhibitors, protein synthesis inhibitors and microtubules synthesis inhibitors [3].

*N*-Myristoyl transferase (NMT) catalyzes the transfer of the 14-carbon saturated fatty acid myristate from myristoyl-CoA to the *N*-terminal glycine residue of a variety of eukaryotic cellular and viral proteins [4-6]. NMT's are involved in a wide variety of biological processes and include protein kinases, kinase substrates, protein phosphatases,  $\alpha$ -subunits of many heterotrimeric G-proteins and endothelial cell nitric oxide synthase [6]. NMT participates in diverse biological processes, including signal transduction cascades and apoptosis [4, 5]. NMT has even been employed as drug target for human pathogens as *Candida* and proposed as drug target of antitrypanosomatid and antimalarial therapeutics [7]. NMT has been reported as a potential drug target since it is involved in signaling networks and it is essential for the growth of human pathogens such as *C. albicans* [8]. The accepted action mechanism of NMT is schematized in Figure 1a [9, 10].

There are several chemical structure types which have demonstrated antifungal activity such as azoles, morpholines and other heterocyclic compounds [3]. In the same way, different natural compounds have been reported as possible antifungal agents, including phenols, flavonoids, coumarins, quinones, saponins, xanthenes, alkaloids and terpenoids [11-13]. However, the screening of a great number of compounds is a limiting step in current researches. Virtual screening is a powerful computational tool that let to accomplish a preliminary searching of active compounds by means of molecular data banks [10]. Molecular docking consists of accurately prediction of the structure of a ligand within the constraints of a receptor binding site and to correctly estimation of the binding strength [14, 15]. Although docking scores are highly susceptible to preparation conditions of active sites and ligands, the comparison of them under exactly determined conditions constitutes a great indicative of the relative activity of the tested molecules as inhibitors of the target enzyme [14-18]. Molecular docking has increased its use as a fundamental tool of research on drug discovery and has been then improved in recent years [16-18].

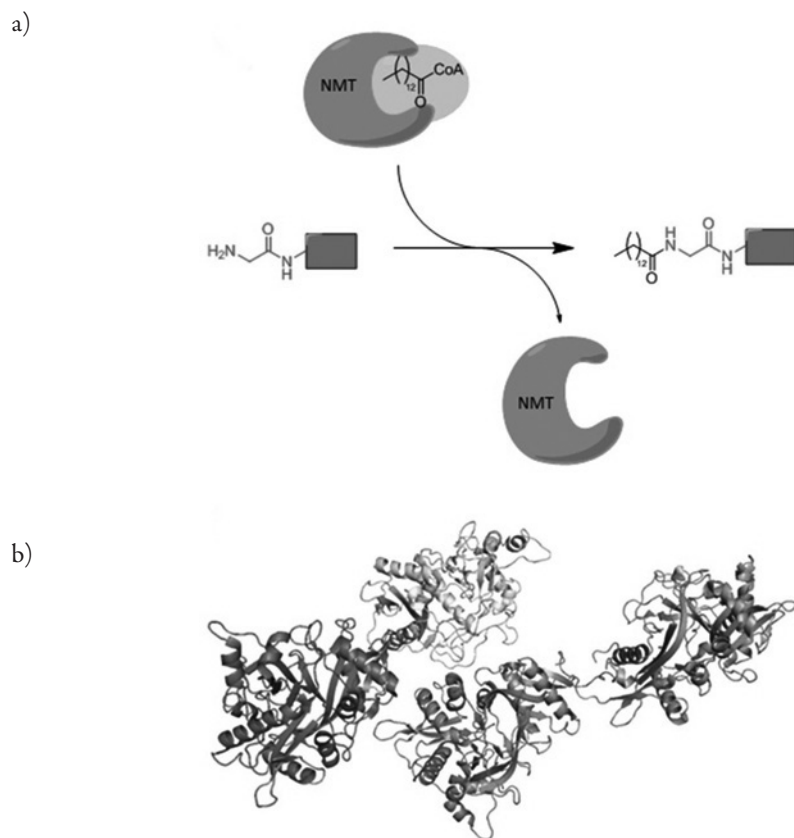


Figure 1. Schematic representation of the action mechanism of NMT (a) and its quaternary structure with each subunit in a different color (b).

The aim of the present research was to perform a molecular docking study of thirty-two naturally-occurring compounds against *N*-myristoyl transferase from *Candida albicans*. The docked natural compounds were previously reported as possible antifungal leads. Here NMT is proposed as an important antifungal agent target. The results are also analyzed by means of pharmacophore modeling.

## METHODOLOGY

Thirty-two natural compounds were selected as common reported antifungal natural compounds from literature [11, 13]. All chemical structures were sketched in ChemBioDraw Ultra 12.0 (CambridgeSoft) and shown in Figure 1. Conformational searching was carried out in Spartan'14 (Wavefunction, Inc.) employing AM1 semiempirical method. Geometry optimization of the lowest energy conformer was accomplished by density functional methods (DFT) at the B3LYP/6-31G\* level. The same procedure was repeated with the structure of **33**, a reported synthetic heterocyclic inhibitor (Figure 1).

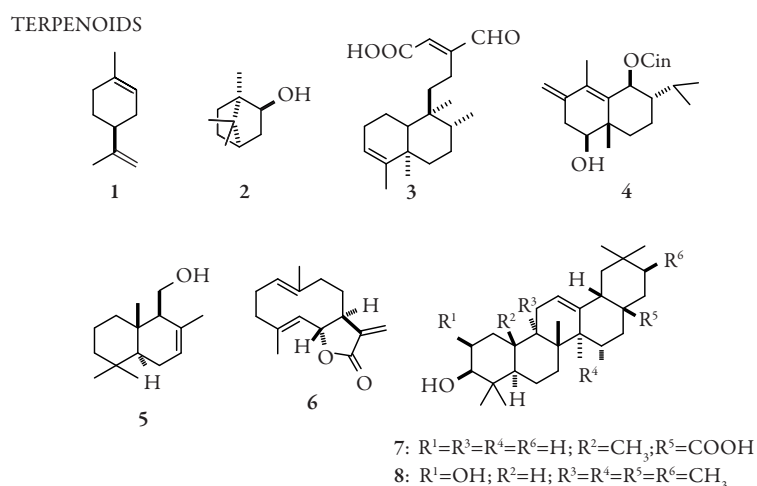
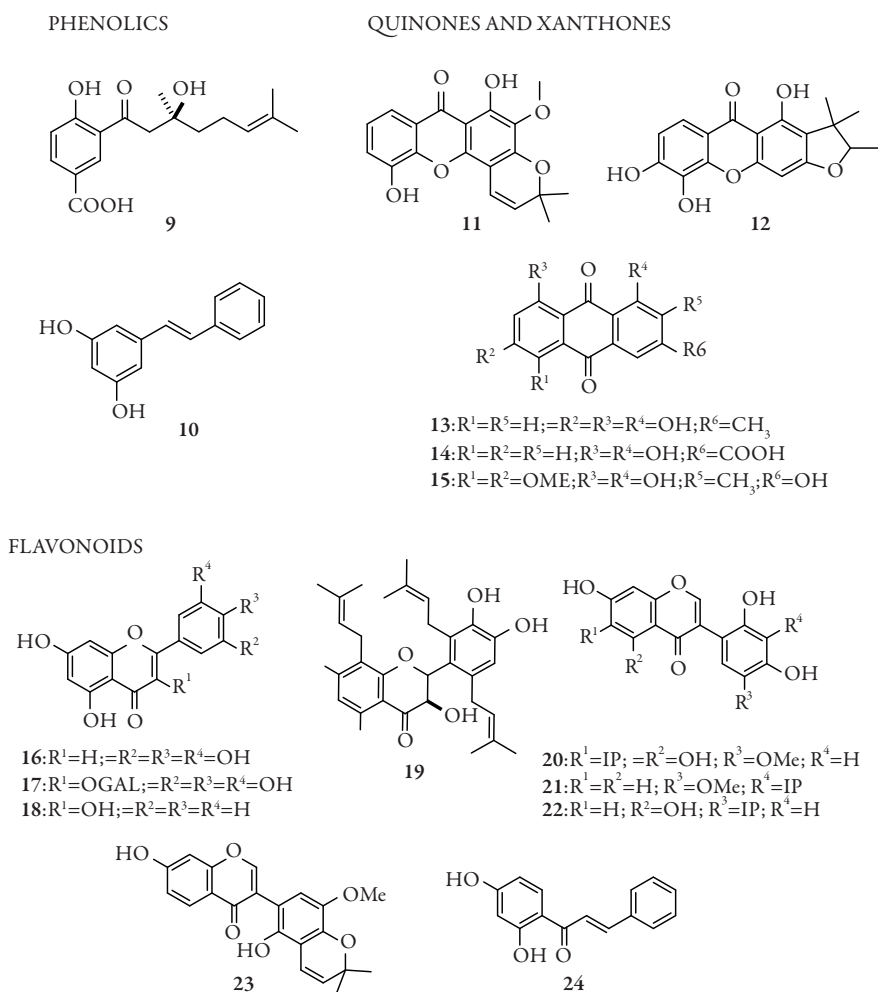


Figure 2. Chemical structures of the analyzed compounds.

NMT pdb file was downloaded from Protein Data Bank (PDB) with the code 1IYL (Figure 2). The structure of the protein was submitted for removing of hydrogen atoms and crystalized ligand structures. The active site was delimited based on reported residues at PDB and complemented with searching of close residues until 5 Å far crystalized inhibitor supported by AutoDock Tools (The Scripps Research Institute). Thus, active site was constituted by following residues: Asp-110, Phe-117, Tyr-225, Leu-337, Tyr-354, Asn-392, Cys-393, Leu-394, and Leu-451. All molecular docking assays were carried out using flexible residues.



Figure 2. Chemical structures of the analyzed compounds (*continued*).

Ligand and protein was docked employing AutoDock/Vina [19]. This program is based on the Iterated Local Search global optimizer by means of which several steps of mutation and local optimization are performed and then accepted by Metropolis criterion [19]. The strongest docked pose was analyzed in Pymol (Schödinger). All calculations were performed in a Dual Intel Xeon® processor CPU @ 2.6 GHz of Intel system origin, with 16 GB DDR3 RAM. Ligand preparation processes was run under Microsoft Windows 8 operating system while docking was compiled under Ubuntu 12.04 operating system.

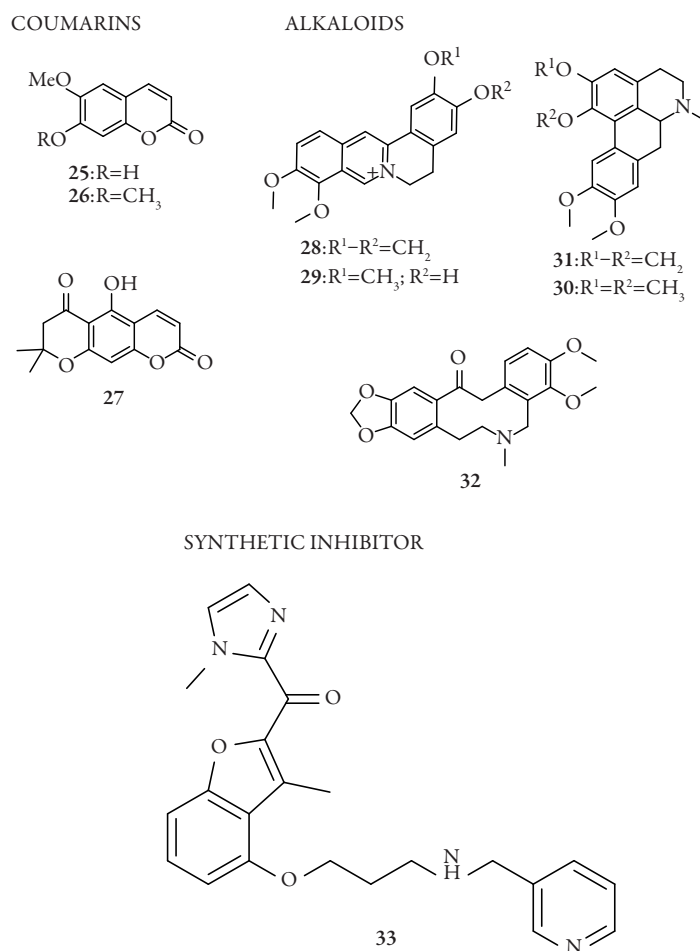


Figure 2. Chemical structures of the analyzed compounds (*continued*).

Residual interactions maps were obtained with Discovery Studio (Accelrys software Inc.) using the AutoDock/Vina outputs (pdbqt files) for compounds that exhibited highest affinity energy. Pharmacophore analysis was also performed for those compounds. This analysis was accomplished with pharmacophore modeling tool from LigandScout (Gerhard Wolber and Inte:Ligand GmbH). Suitable pdb files from Discovery Studio were used as input in LigandScout.

## RESULTS AND DISCUSSION

Performance of the AutoDock Vina algorithm on NMT – ligand complexation was evaluated by re-docking protocol applied on co-crystallized structure of **33**. Ten runs for **33** were carried out and root mean square deviation (RMSD) values were then calculated. A mean RMSD of 2.08 Å ( $\pm 0.45$  Å) was found. This RMSD value was accepted as validation criteria for the docking algorithm. Moreover, some difference between co-crystallized and calculated pose can be expected due to the freedom degrees of the structure of **33**. The calculated pose was also validated by observing molecular contacts with NMT pocket residues and comparing them with those reported in the crystal structure of the NMT-**33** complex.

Thirty-two compounds previously reported as antifungal substances were selected as possible lead structures (Figure 2). These were submitted to conformational searching and the most stable conformer was then optimized at DFT level. Inhibitory potential of the obtained structures to NMT were evaluated by means of molecular docking. The results of molecular docking were first analyzed in terms of affinity energy (Table 1).

Table 1. Molecular docking scores of natural compounds inside the binding site of NMT.

Type	Compound	Affinity (kcal/mol)	Common Name
Alkaloids	30	-11.1	Dicentrine
	28	-9.7	Berberine
	29	-9.4	Jatrorrhizine
	32	-9.3	$\alpha$ -allocryptopine
	31	-9.0	Glaucine
	mean (RSD)	-9.7 (8.5%)	
Flavonoids	19	-10.7	Petalostemumol
	22	-10.3	Allolicoisoflavone A
	17	-10.1	Hyperoside
	18	-10.1	Galangin
	21	-10.0	Piscisoflavone A
	23	-9.7	Piscisoflavone B
	16	-9.6	Tricetin
	20	-9.2	Isopiscerythron
	24	-8.4	2',4'-dihydroxychalcone

*(It continues)*

Table 1. Molecular docking scores of natural compounds inside the binding site of NMT. (Continued)

Type	Compound	Affinity (kcal/mol)	Common Name
Flavonoids	mean (RSD)	-9.8 (6.9%)	
Xanthones	12	-10.6	Toxyloxanthone C
	11	-10.4	Caledonixanthone E
	mean (RSD)	-10.5 (1.3%)	
Quinones	13	-10.3	Emodin
	14	-9.8	Rhein
	15	-9.5	Anthraquinone derivative
	mean (RSD)	-9.9 (4.1%)	
Terpenoids	8	-10.2	Tetraterpenol derivative
	4	-9.7	Eudesm-4-en-3-one derivative
	7	-9.4	Oleanolic acid
	3	-9.1	Clerodanoic acid derivative
	6	-8.7	Costunolide
	5	-8.0	Drimenol
	1	-6.4	Limonene
	2	-5.3	Borneol
	mean (RSD)	-8.4 (20.4%)	
Coumarins	27	-9.8	Clausenin
	25	-6.9	Scopoletin
	26	-6.9	6,7-dimethoxycoumarin
	mean (RSD)	-7.9 (21.3%)	
Phenolics	10	-8.5	3,5-dihydroxystilbene
	9	-7.8	Crassinervic acid
	mean (RSD)	-8.2 (6.1%)	
	33	-10.6	Synthetic Inhibitor

Lowest Affinity with the NMT-active site (mean affinity between  $-7.9$  and  $-8.4$  kcal/mol and high RSD values) were found for coumarins, terpenoids and phenolics (Table 1). Quinones, flavonoids and alkaloids resulted to be very similar regarding mean affinity from analyzed compounds with lower RSD values. Comparable antifungal effect

could be expected due to NMT inhibition. Xanthenes were those with the highest mean affinity energy toward NMT, and let us to establish them as ideal lead compound candidates. Moreover, these structures (11 and 12) exhibited very close affinity values to that of the synthetic inhibitor 33 despite the great chemical structural differences. In depth, the above mentioned xanthenes are quite structurally dissimilar (11 possess a pyran-ring while 12 possess a furan-ring). However, both compounds are 1,3,5-trioxygenated. Simultaneously, pyran and furan rings seem to be not related to NMT interaction according to the found affinity. Further SAR studies for 1,3,5-trioxygenated xanthenes are therefore required.

On the other hand, NMT–flavonoids interaction values were found to be highly variable (ranging between  $-8.4$  to  $-10.7$  kcal/mol; RSD = 8.4%) demonstrating that affinity depends on structure. On comparing 16, 17 and 18, structure–affinity relationships can be observed; 17 and 18 affinities exhibited identical value, indicating no effect by the presence of galactose moiety at C3–O. Nevertheless, oxygenation at C3 resulted to be essential to the interaction with NMT-active site (significant difference between 16 and 17 or 18 docking scores). Regarding isoflavones 20–22, affinity demonstrated to be very sensible to the positions of isoprenyl and hydroxyl group. The interaction 19–NMT was significantly higher to those of other docked flavonoids. However, other prenylated flavonols were not tested in the present study, so clear conclusions can't be established.

Ligand–enzyme affinity for alkaloids was found to be low ( $-9.7$  kcal/mol as mean docking score) excepting 30, which demonstrated to achieve an important strong affinity with NMT ( $-11.1$  kcal/mol; Table 1). The presence of a methylenedioxy group instead two methyl groups was preferred for the interaction with NMT (on comparing 30 with 31). 33 corresponds to a synthetic heterocyclic compound without structural similarity from 30. This fact let us to expect a different action mode for the above mentioned compound despite the closely related affinity energy. Compound 30 do not showed any polar contact with the amino acid residues from the NMT-active site, indicating a purely hydrophobic interaction with it. Moreover, 3D enzyme–ligand complex structure (Figure 3a) demonstrated a coplanar location of 30 with respect to Tyr-225 inferring a strong  $\pi$ - $\pi$  interaction between phenyl rings ( $\sim 3.6$  Å).

No polar contacts were detected for compound 19. Instead of these the isoprenyl group at C<sub>6</sub> on B ring was located between phenyl ring of Tyr-225 and Asn-392 amino group (3.8 and 3.7 Å, respectively) (Figure 3b). Other possible hydrophobic interaction between Tyr-354 and its B ring could be proposed, although this is not a pure  $\pi$ - $\pi$  interaction due to the lack of coplanarity.

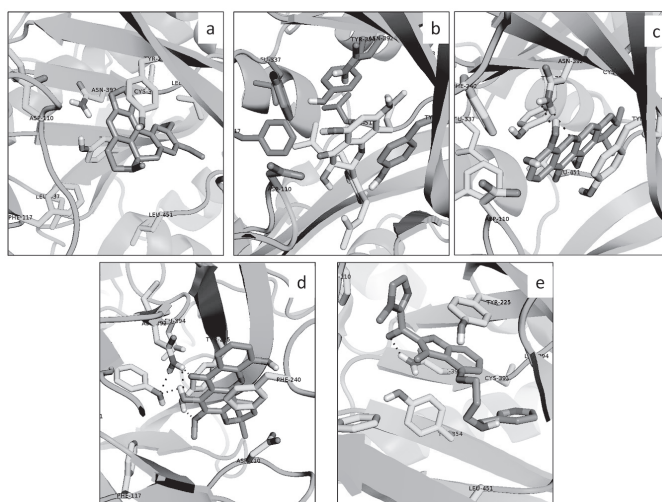


Figure 3. Docking conformations for selected ligand–enzyme complexes (visualized on Pymol). NMT – 30 (a), NMT – 19 (b), NMT – 12 (c), NMT – 11 (d), NMT – 33 (e). Dotted lines represent hydrogen bond interactions.

Two hydrogen bondings between amino group of Asn-392 and **12** were found (Figure 3c). An oxygen atom of the dibenzo- $\gamma$ -pyrone moiety and a hydroxyl group at C<sub>5</sub> were responsible of these polar interactions (2.3 and 2.6 Å, respectively). Simultaneously, a near  $\pi$ - $\pi$  hydrophobic interaction can be inferred among Tyr-225 and the heterocyclic ring of the dibenzo- $\gamma$ -pyrone moiety (mean distance = 3.6 Å). The same polar contacts were found for **11** (1.9 and 2.6 Å; Figure 3d). Moreover, hydrogen bonding between hydroxyl groups at Tyr-225 and C<sub>2</sub> of **11** was clearly evident (2.2 Å). A weak hydrophobic interaction between A ring and Tyr-225 (5 Å aprox.) and a direct  $\pi$  -  $\pi$  interaction between B ring and Phe-240 (mean distance of 3.6 Å) were also identified in the NMT–**11** complex. In spite of the differences at molecular level and the found interactions in **11** and **12**, not significant differences on affinity energy were established (0.2 kcal/mol, which can be attributed to the difference inherent to the molecular docking method). Therefore, 5-hydroxy-dibenzo- $\gamma$ -pyrone structure could be subjected to further QSAR studies.

In order to improve the information extracted from molecular docking results, docked molecules were analyzed regarding residual interactions with Discovery Studio (Accelrys software Inc.). Residual interactions map (Figure 4) highlights additional enzyme–ligand interactions that are not evident from the docked results viewed with Pymol. Here, only hydrophobic interactions between **30** and NMT were defined (Figure 4a).

In this enzyme–ligand complex,  $\pi$ -electron acceptor character from His-227, Asn-392 and Leu-450 were showed. A double hydrogen bonding between Thr-211 residue and the carbonyl and hydroxyl groups at  $\gamma$ -pyrone moiety was observed for compound **19**. These *H*-bonds were not evident in the primary docked structure since Thr-211 residue was not considered into the set of residues comprising the active site of the NMT. The present analysis can determine some interaction from *ortho*-dihydroxy group of B ring in **19** with Tyr-354 residue as *H*-acceptor. Accordingly, Val-108, Tyr-107, Phe-117, and Phe-339 demonstrated to be  $\pi$ - and *H*-donors to **19** interacting thus with different parts of the molecule (Figure 4b).

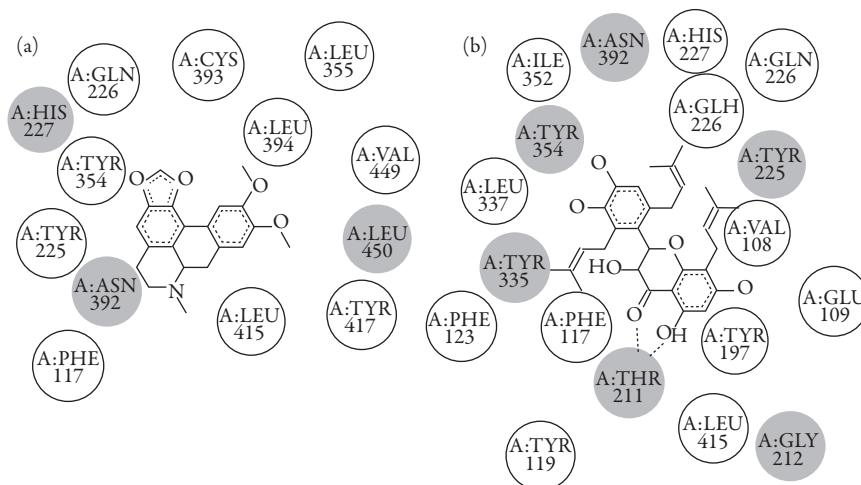


Figure 4. Residual interactions map for compounds **30** (a) and **19** (b) in the binding pocket of NMT (generated by Discovery Studio). Donor (green) and acceptor (purple).

Finally, pharmacophore analyses for **11**, **12**, **19** and **30** were developed (Figure 5) employing the pharmacophore modeling tool from LigandScout (Gerhard Wolber and Inte:Ligand GmbH).  $\pi$ - $\pi$  interaction between aromatic ring at quinoline system of **30** and Tyr-225 residue was confirmed as the main interaction in the minimum energy pose for the resulting ligand–enzyme complex (Figure 5a). The importance of isoprenyl groups as the key hydrophobic regions for the interaction with NMT-pocket residues was established by pharmacophore modeling (Figure 5b). This fact could be inferred from the differential affinity energy of **19** from the rest of the tested flavonoids (Table 1). On the other hand, LigandScout was not able to define interaction between

**19** and Thr-211 residue in spite of the spatial proximity between them (Discovery Studio showed this interaction as mentioned above and observed in Figure 4b).

For compound **11**, several structural requirements to interact with NMT under pharmacophore modeling were found (Figures 5d). Hydrophobic contacts from B ring and methyl groups on pyrone moiety were evident. Moreover, hydrogen bonds for carbonyl, hydroxyl and methoxy groups were confirmed by interacting with Ans-392, Tyr-354, Tyr-225 residues, respectively. Finally,  $\pi$ - $\pi$  interactions among A ring of the  $\gamma$ -pyrone moiety and near aromatic residues were established as shown in Figure 5d. For compound **12**, hydrophobic contacts for B ring and methyl groups from the furan ring could be proposed as key interactions (Figure 5c). Furthermore, hydrogen bonding between His-227 and one hydroxyl group in B ring of **12** can be proposed from the pharmacophore modeling (Figure 5c). Significant differences with regard to the best docking poses and the corresponding ligand-pocket residues interactions were found. Therefore, completely different action mechanisms on NMT inhibition should be expected for the tested and described natural compounds.

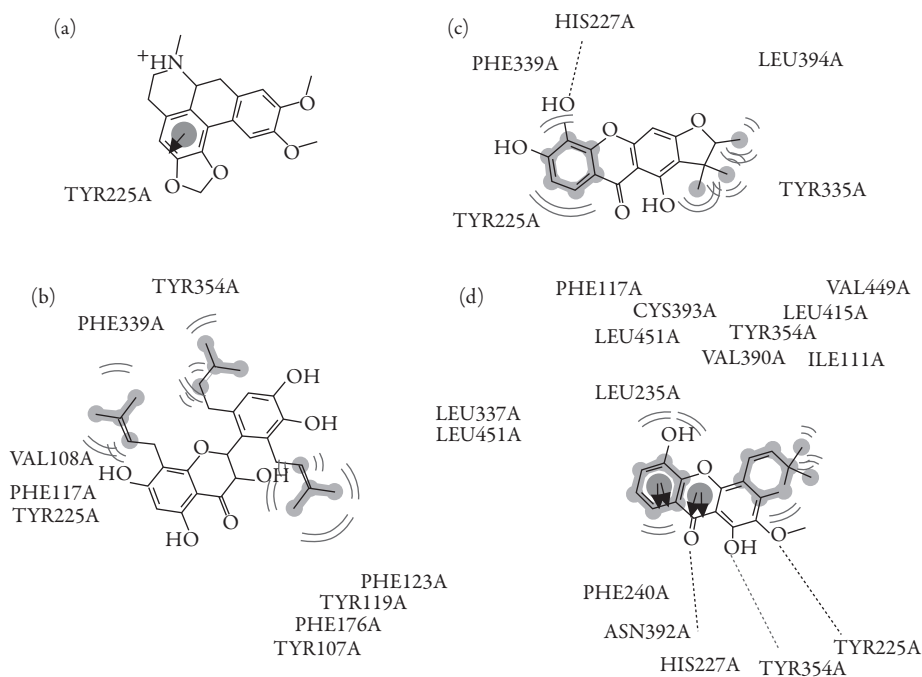


Figure 5. 2D pharmacophore modeling for compounds **30** (a), **19** (b), **12** (c) and **11** (d) in the binding pocket of NMT (generated by LigandScout). Hydrophobic interaction (yellow),  $\pi$ - $\pi$  interaction (purple), and Hydrogen bonding (acceptor in green and donor in red) are showed.



Indeed, compounds **30** and **19** have been reported as antifungal and/or antimicrobial agents. **30** was reported as the most active alkaloid from *Glaucium oxylobum* compared with glaucine, protopine,  $\alpha$ -allocryptopine, and *O*-methylflavinantine [20]. In this study, dicentrine (**30**) resulted to be highly active against *Microsporum gypseum*, *Trichophyton mentagrophytes* and *Epidermophyton floccosum* ( $\alpha$ -allocryptopine was only comparable against *Epidermophyton floccosum*). In a similar way, **19** was reported as the most active compound from a set of seven structurally related flavonoids (four times more active than others) [21]. This marked activity was demonstrated against *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, *Mycobacterium intracellulare*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Bacillus subtilis*. Compounds **12** and **11** have also been reported as potential antifungal natural compounds [22, 23]. In these literature reports, **12** showed markedly antifungal activity against *Candida albicans* [22], while **11** exhibited the strongest activity against *Aspergillus fumigatus* [23]. However, Larcher et al. [23] suggested a chitin synthesis inhibition mechanism. Furthermore, **12** was reported as inhibitory substance of *B. subtilis* and *S. aureus* with medium activity respect another natural xanthenes from *Cudrania cochinchinensis* [24]. Antifungal activity of natural and synthetic xanthenes have been analyzed and reported against several fungal strains [25, 26], however there are not previous QSAR analyses.

In conclusion, thirty-two compounds from natural sources were tested as inhibitors of the *N*-myristoyl transferase *via* molecular docking. From docked compounds, xanthenes demonstrated to be able to form strong complexes with NMT. However, a prenylated flavonoid and an aporphine alkaloid were found as those with strongest interaction with NMT. The present findings let to propose at least four compounds as possible lead structures as potent inhibitors of NMT. At the same time, NMT could constitute an efficient and unexplored target for *in-silico* antifungal drug discovery researches. Nevertheless, due to the well-known limitations of the molecular docking calculations, future studies must be conducted using molecular dynamics simulations in order to get more reliable data as well as the validation at *in-vitro* level of these calculations in further binding affinity experiments with the aim to perform QSAR studies on compound series from the detected hits as second step in our research.

## ACKNOWLEDGMENTS

Authors thank Vicerrectoría de Investigaciones at Universidad Militar Nueva Granada - Validity 2013 for the financial support of the Project CIAS-1331.

## REFERENCES

1. J.B. Anderson, Evolution of antifungal - drug resistance: Mechanisms and pathogen fitness, *Nature Reviews*, **3**, 547 (2005).
2. R.E. Lewis, Current concepts in antifungal pharmacology, *Mayo Clinic Proceedings*, **86**, 805 (2011).
3. M.K. Kathiravan, A.B. Salake, A.S. Chothe, P.B. Dudhe, R.P. Watode, M.S. Mukta, S. Gadhwe, The biology and chemistry of antifungal agents: A review, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **20**, 5678 (2012).
4. J.A. Boutin, Myristoylation, *Cellular signaling*, **9**, 15 (1997).
5. S. Sogabe, M. Masubuchi, K. Sakata, T.A. Fukami, K. Morikami, Y. Shiratori, H. Ebiike, K. Kawasaki, Y. Aoki, N. Shimma, A. D'Arcy, F.K. Winkler, D.W. Banner, T. Ohtsuka, Crystal structures of *Candida albicans* *N*-myristoyltransferase with two distinct inhibitors, *Chemistry & Biology*, **9**, 1119 (2002).
6. R.S. Bhatnagar, K. Fütterer, T.A. Farazi, S. Korolev, C.L. Murray, E. Jackson-Machelski, G.W. Gokel, J.I. Gordon, G. Waksman, Structure of *N*-myristoyltransferase with bound myristoylCoA and peptide substrate analogs, *Nature*, **5**, 1091 (1998).
7. M.H. Gelb, W.C. Van Voorhis, F.S. Buckner, K. Yokoyama, R. Eastman, E.P. Carpenter, C. Panethymitaki, K.A. Brown, D.F. Smith, Protein farnesyl and *N*-myristoyl transferases: Piggy-back medicinal chemistry targets for the development of antitrypanosomatid and antimalarial therapeutics, *Molecular & Biochemical Parasitology*, **126**, 155 (2003).
8. M.H. Wright, W.P. Heal, D.J. Mann, E.W. Tate, Protein myristoylation in health and disease, *Journal of Chemical Biology*, **3**, 19 (2010).
9. E. Thinon, R.A. Serwa, M. Broncel, J.A. Brannigan, U. Brassat, M.H. Wright, W.P. Heal, A.J. Wilkinson, D.J. Mann, E.W. Tate, Global profiling of co- and post-translationally *N*-myristoylated proteomes in human cells, *Nature Communications*, **5**, 4919 (2014).
10. D. Rognan, Virtual screening by molecular docking. In: "Chemogenomics and chemical genetics: A user's introduction for biologists, chemists and informaticians," E. Maréchal *et al.* (editors), Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2011.

11. T. Arif, J.D. Bhosale, N. Kumar, T.K. Mandal, R.S. Bendre, G.S. Lavekar and R. Dabur, Natural products – antifungal agents derived from plants, *Journal of Asian Natural Products Research*, **11**, 621 (2009).
12. M.J. Abad, M. Ansuategui, P. Bermejo, Active antifungal substances from natural sources, *ARKIVOC*, vii, 116 (2007).
13. T. Arif, T.K. Mandal, R. Dabur, “Natural products: Anti-fungal agents from plants”. In: *Opportunity, Challenge and Scope of Natural Products in Medicinal Chemistry*, V.K. Tiwari, B.B. Mishra (editors), Research Signpost, Kerala, India, 2011, pp. 283-311.
14. D.B. Kitchen, H. Decornez, J.R. Furr, J. Bajorath, Docking and scoring in virtual screening for drug discovery: Methods and applications, *Nature Reviews*, **3**, 935 (2004).
15. E. Yuriev, P.A. Ramsland, Latest developments in molecular docking: 2010-2011, *Journal of Molecular Recognition*, **26**, 215 (2013).
16. K.M. Elokely, R.J. Doerksen, Docking challenge: Protein sampling and molecular docking performance, *Journal of Chemical and Information Modeling*, **53**, 1934 (2013).
17. X.-Y. Meng, H.-X. Zhang, M. Mezei, M. Cui, Molecular Docking: A powerful approach for structure-based drug discovery, *Current Computer-Aided Drug Design*, **7**, 146 (2001).
18. S.-Y. Huang, X. Zou, Advances and challenges in protein-ligand docking, *International Journal of Molecular Sciences*, **11**, 3016 (2010).
19. O. Trott, A.J. Olson, AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization and multithreading, *Journal of Computational Chemistry*, **31**, 455 (2010).
20. K. Morteza-Semnania, G. Amin, M.R. Shidfar, H. Hadizadeh, A. Shafiee, Antifungal activity of the methanolic extract and alkaloids of *Glaucium oxylobum*, *Fitoterapia*, **74**, 493 (2003).
21. C.D. Hufford, Y. Jia, E.M. Croom Jr., I. Muhammed, A.L. Okunade, A.M. Clark, Antimicrobial compounds from *Petalostemum purpureum*, *Journal of Natural Products*, **56**, 1878 (1993).

22. Y-H. Wang, A-J. Hou, G-F. Zhu, D-F. Chen, H-D. Sun, Cytotoxic and anti-fungal isoprenylated xanthenes and flavonoids from *Cudrania fruticosa*, *Planta Medica*, **71**, 273 (2005).
23. G. Larcher, C. Morel, G. Tronchin, A. Landreau, D. Séraphin, P. Richomme, J-P. Bouchara, Investigation of the antifungal activity of caledonixanthone E and other xanthenes against *Aspergillus fumigatus*, *Planta Medica*, **70**, 569 (2004).
24. T. Fukai, Y. Oku, A-J. Hou, M. Yonekawa, S. Terada, Antimicrobial activity of hydrophobic xanthenes from *Cudrania cochinchinensis* against *Bacillus subtilis* and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, *Chemistry & Biodiversity*, **1**, 138 (2004).
25. G. Gopalakrishnan, B. Banumathi, G. Suresh, Evaluation of the antifungal activity of natural xanthenes from *Garcinia mangostana* and their synthetic derivatives, *Journal of Natural Products*, **60**, 519 (1997).
26. E. Pinto, C. Alfonso, S. Duarte, L. Vale-Silva, E. Costa, E. Sousa, M. Pinto, Anti-fungal activity of xanthenes: Evaluation of their effect on ergosterol biosynthesis by high-performance liquid chromatography, *Chemical Biology & Drug Design*, **77**, 212 (2011).

## Uso indiscriminado de diclofenaco de potássio pela população idosa na cidade de Anápolis, no estado de Goiás, Brasil em 2014.

Rosa Silva Lima<sup>1,2\*</sup>, Maria Jéssica Rocha Rodrigues<sup>2</sup>, Thatiane Rodrigues da Silva<sup>2</sup>, Celice Novais<sup>1</sup>, Plínio Naves<sup>3</sup>.

<sup>1</sup> Laboratório de Síntese orgânica, Instituto de Química 1, Universidade Federal de Goiás, Campus Samambaia, 74690-900 Goiânia, GO, Brasil.

<sup>2</sup> Faculdade do Instituto Brasil/FIBRA, Br 060/153, KM97 3400, 75133-050 Anápolis, GO, Brasil.

<sup>3</sup> Laboratório de Microbiologia, Unidade Universitaria de Ciencias Exatas e Tecnológicas, Universidade Estadual de Goiás, 75132-903 Anápolis, GO, Brasil.

\*E-mail:rosinha.576@hotmail.com

Recibido para evaluación: 26 de diciembre de 2014

Aceptado para publicación: 20 de mayo de 2015

### RESUMO

O presente estudo teve como finalidade evidenciar o uso indiscriminado de diclofenaco de potássio e o desconhecimento dos efeitos colaterais deste medicamento contidos na bula pelos idosos do Município de Anápolis, Goiás em 2014. Trata-se de uma pesquisa analítica em loco que teve como amostra 2500 indivíduos idosos de 58-77 anos. Os dados foram compilados através de questionários e revelaram que a droga foi extensivamente utilizada pelos entrevistados sem receituário médico. Dentre os motivos que os levaram a adquirir o diclofenaco de potássio, ressaltam-se: o preço acessível e à eficácia da droga sobre sintomas como dores no corpo, principalmente nas pernas e costas. Foi detectado um estímulo a automedicação resultante do sistema de vendas praticado nas drogarias, nas quais atendentes sem conhecimento farmacológico pertinente realizam indicações de fármacos sem conhecimento técnico. Os resultados da pesquisa reforçam a necessidade de maiores orientações sobre o uso racional desse medicamento, uma vez que o consumo inadequado pode ocasionar distúrbios gástricos, renais e circulatórios.

*Palavras chaves:* Anti-inflamatórios não estereoidais, idosos, medicamentos, diclofenaco de potássio e automedicação.

## SUMMARY

### Indiscriminate use of diclofenac potassium for elderly population in Anápolis city, state of Goiás, Brazil in 2014

This work intended to evaluate the drug abuse and the knowledge of side effects presented in the guidelines of potassium diclophenac used by elderly people from Anapolis-Brazil. In this study, 2500 people, ranging between 58 and 77 years old, were interviewed in 2014. The data collected by a questionnaire revealed the excessive use of this drug without medical prescription. The main reasons raised by the respondents, when asked about why they use this drug, were the affordable price and the efficiency of potassium diclophenac in the common symptoms at this age, especially back and joint pain. The market, with unprepared sellers, stimulates self-medication and input a risk at the health of Brazilian population. The results presented the need of further guidance on the rational use of this drug, since inadequate intake may cause stomach, kidney and circulatory disorders.

*Key words:* Nonsteroidal anti-inflammatory drugs, elderly, medicines, diclofenac potassium and self-medication.

## INTRODUÇÃO

Lançado no mercado japonês no início de 1974, o diclofenaco atualmente, pode ser encontrado em cerca de 120 países em todo mundo, tendo sido aprovado pelo FDA (Food and Drug Administration) em 1988, como a primeira droga antiinflamatória não esteroideal (AINE). Apresenta-se na forma de um sal potássico, derivado do ácido benzoacético. Denominado quimicamente por 2-[2,6-diclofenil amino] ácido benzoacético, sal monopotássico [1, 2].

Fórmula molecular:  $C_{14}H_{10}C_{12}KNO_2$  e peso molecular: 334,25. Sua descrição é como um pó cristalino branco ou levemente amarelo, levemente higroscópico, solúvel em água, facilmente solúvel em metanol, solúvel em álcool, pouco solúvel em acetona [3, 4].

O diclofenaco está presente no mercado na forma de sal livre, sal sódico ou sal potássico. Esta última salificação é mais solúvel, promovendo uma taxa maior de absorção,

consequentemente um efeito analgésico mais rápido em comparação com as outras formas administradas por via oral. O medicamento de referência para diclofenaco de potássio é Cataflam<sup>®</sup> com apresentação de drágeas 50mg de liberação imediata [5-7].

O diclofenaco de potássio é indicado para um tratamento de curto prazo para as seguintes condições agudas: estado de dor inflamatória pós-traumática (causadas por entorses) e pós-operatória (cirurgias ortopédicas ou odontológicas); condições inflamatórias e/ou dolorosas em ginecologia (dismenorréia primária); nas crises de enxaqueca, alivia a dor de cabeça e melhora os sintomas de náuseas e vômito; sintomas dolorosos da coluna vertebral; reumatismo não articular e no tratamento da dor, inflamação e febre que acompanham os processos infecciosos de ouvido, nariz e garganta (faringoamigdalites e otites) [4].

O medicamento é contra-indicado em casos de pacientes com úlcera gástrica ou intestinal e aos que possuem conhecida hipersensibilidade à substância ativa ou a qualquer outro componente da formulação. Também é contra-indicado a pacientes que têm crises de asma, urticária e rinite aguda quando tomam ácido acetilsalicílico (ex: aspirina) ou outras drogas com atividade inibitória da prostaglandina sintetase [4].

As reações adversas relatadas pelo uso da droga em uso por curto ou longo prazo são [4]: Trato gastrointestinal: epigastralgia, distúrbios gastrintestinais tais como náusea, vômito, diarreia, cólicas abdominais, dispepsia, flatulência, anorexia e irritação local. Sistema nervoso central: cefaléia, tontura e vertigem. Fígado: elevação dos níveis séricos das enzimas aminotransferases. Pele: rash ou erupções cutâneas.

Neste contexto, o presente trabalho teve como objetivo pesquisar o uso de diclofenaco de potássio por idosos de 58-77 anos, na cidade de Anápolis no estado de Goiás em 2014, bem como analisar o atendimento e a atenção dos farmacêuticos e atendentes aos idosos na compra de medicamentos. Os resultados serviram para alertar aos estudantes do curso de farmácia sobre a importância dos cuidados aos idosos.

## METODOLOGIA

Trata-se de uma pesquisa exploratória de caráter descritivo, que permite a compilação de informações, através de recursos metodológicos, possuindo uma abordagem qualitativa.

Durante a disciplina de Química para o curso de Farmácia em 2014, foram levantadas questões sobre o uso de remédios em geral. O fato de que os idosos têm facilidade em comprar remédios sem receita médica e os perigos que essa prática representa para esse

grupo interessou aos estudantes, de tal forma que se propôs a realização desta pesquisa de natureza qualitativa através de um questionário.

Em seguida, foi definido o diclofenaco de potássio por ser um medicamento muito usado pelas pessoas nessa faixa etária. Foram entrevistados 2500 idosos que foram orientados a responder as perguntas no período de janeiro a abril de 2014, no centro da cidade de Anápolis.

O questionário foi composto de quatro perguntas e se encontra em anexo.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dos 2500 entrevistados, 60% (1500) foram do sexo feminino e 40% (1000) do sexo masculino. A faixa etária estudada foi compreendida entre os 58 a 77 anos. Os resultados da pesquisa foram bem expressivos, as pessoas entrevistadas disseram que é muito fácil comprar o diclofenaco nas farmácias sem receita, pois ele é liberado para a venda, em algumas farmácias os atendentes perguntaram se eles tinham a receita médica, e que mesmo sem ter a receita compraram o medicamento, os resultados estão na tabela 1.

Os anti-inflamatórios não-esteróides são medicamentos notoriamente utilizados por toda a população mundial como fármacos muito eficazes e seguros, mas, todavia, ocasionam inúmeros tipos de reações adversas podendo até causar a morte [8].

Tabela 1. Compra de diclofenaco de potássio com receituário médico e sem, Anápolis, Goiás, 2014.

Com receituário médico	No de entrevistados	Percentual (%)
Sim	375	15,0
Não	2125	85,0
Total	2500	100,0

Em nenhum estabelecimento farmacêutico, os idosos foram informados dos perigos de se automedicar, pois nos estabelecimentos os atendentes não são farmacêuticos, apenas pessoas treinadas a venderem medicamentos. Foi detectado que em 70% desses estabelecimentos só havia um farmacêutico responsável, dado que demonstra um número insuficiente de profissionais para uma cidade com quase 400 mil habitantes.

Quando perguntados por que eles tomavam o diclofenaco de potássio, responderam que o medicamento é bom para curar dores nas pernas e costas, e que é acessível. Dez por cento dos entrevistados disseram que o remédio foi indicado por um amigo e que era bom para curar dores, os resultados estão na tabela 2.



Tabela 2. Principais sintomas que levaram os idosos a comprar o diclofenaco de potássio, Anápolis, Goiás, 2014.

Sintomas	Número de sintomas	Percentual (%) com Prescrição médica
Dores nas costas	875	10,6
Dores nas pernas	425	9,0
Dor de cabeça	175	6,7
Dores no joelho	125	9,0
Reumatismo	200	8,7
Dores nas articulações	300	12,0
Outros	400	3,0
Total	2500	

A negligência em relação a leitura da bula do medicamento foi detectada como um fato alarmante, pois 45% dos entrevistados disseram que não sabiam ler e 55% disseram que tinham problemas de visão e que não perdiam com esta leitura, pois é muito cansativa e que só queriam se livrar das dores.

Os medicamentos anti-inflamatórios não estereoidais estão entre as drogas mais comumente usadas no mundo. Essas drogas exercem seus efeitos benéficos anti-inflamatórios, analgésicos e antipiréticos pela inibição da ciclooxigenase (COX), a enzima chave na indução da síntese de prostaglandinas [9].

No Brasil os AINEs são amplamente utilizados, bem como na prática de automedicação. No ano de 2011, o medicamento mais vendido, no Brasil, foi o Dorflex, seguido da Neosaldina [10]. Os dois medicamentos têm em suas composições a dipirona sódica e outras associações. Mesmo sendo eficiente no tratamento da pirose, a dipirona foi banida de 33 países, por ser responsável por causar aplasia medular, segundo o Formulário Terapêutico Nacional [10]. No Brasil seu uso é liberado pela ANVISA (Agência Nacional de Vigilância sanitária).

Os estudos de base populacional sobre a prevalência e os fatores associados á automedicação ainda são raros no Brasil. Em um município de médio porte do Rio Grande do Sul (Santa Maria), encontrou-se uma prevalência de 53,3% de automedicação, tendo sido os analgésicos, antitérmicos e anti-inflamatórios não estereoidais os mais consumidos (49,2%) [11].

O laboratório Bayer encomendou uma pesquisa ao Instituto Marplan, que mostrou que 49 % das mulheres entrevistadas em oito capitais brasileiras não saem de casa sem um analgésico na bolsa [12].

Na cidade de Vassouras (RJ) Brasil, um estudo sobre a avaliação da automedicação mostrou que, entre os entrevistados, os grupos de medicamentos mais utilizados foram os antigripais, analgésicos, anti-inflamatórios, anticoncepcionais e anti-hipertensivos. O medicamento que liderou a lista de mais usado sem prescrição foi a dipirona, paracetamol e ácido acetilsalicílico [12]. Outra pesquisa realizada corrobora com estes dados e mostra a dipirona em primeiro lugar na incidência de uso de anti-inflamatórios na automedicação, seguido do ácido acetilsalicílico, diclofenaco e paracetamol [13].

Entre 0,5 a 1% dos pacientes em uso crônico de AINEs ocorre à deterioração aguda da função renal [14] e até em 13% dos pacientes mais frágeis, como os idosos [15]. Um em 200 pacientes com mais de 65 anos irá desenvolver insuficiência renal aguda dentro de 45 dias após o início da terapia com os AINEs [16].

Têm-se uma série de razões pelas quais os pacientes idosos são mais suscetíveis à nefrotoxicidade por AINEs. Eles geralmente têm baixos níveis de albumina, resultando no aumento dos níveis de droga livre. Pacientes idosos também apresentam um nível de água corporal reduzido, o que proporciona maiores concentrações dos AINEs, além de possuírem o metabolismo hepático mais lento, o que pode levar a um aumento da concentração sanguínea dos fármacos [17]. Assim, ter mais de 80 anos é considerado um fator de risco independente pela própria fisiologia. Ocorre queda de 50% da função renal em cerca de 50% da população nessa faixa etária, primariamente como resultado da progressão da arteriolonefroesclerose [14].

As consequências do uso indevido de anti-inflamatórios não estereoidais são as reações adversas a fármacos, erros de medicação e desperdícios de recursos, uma vez que de 10% a 40% dos orçamentos nacionais de saúde são gastos em fármacos e se estima um gasto de 3,4 milhões de dólares a cada ano devido às reações adversas, muitas vezes geradas pelo seu uso indevido. O uso rotineiro de AINEs é ligado à concepção de que tais produtos são inofensivos à saúde. Muitos ignoram o fato de que estes fármacos, usados para tentar aliviar sinais e sintomas, sem a supervisão de um médico podem acabar sendo usados inadequadamente e gerar outros sinais e sintomas, possivelmente ainda mais graves do que os iniciais [18].

O uso indiscriminado de medicamentos constitui-se numa epidemia entre idosos, cuja ocorrência tem como cenário o aumento exponencial da prevalência de doenças crônicas e das sequelas advindas do avançar da idade. Aliado a isso, observa-se o poder da indústria farmacêutica e do *marketing* dos medicamentos na formação dos profissionais

da saúde induzindo-os a prescrição e utilização de forma exagerada de medicação nas pessoas dessa faixa etária. Os idosos são mais propensos a intoxicação medicamentosa, pois geralmente são mais vulneráveis e sem informação, consumindo medicamentos muitas vezes mais por costume do que por necessidade.

As consequências do amplo uso de medicamentos têm impacto no âmbito clínico e econômico repercutindo na segurança do paciente. E, a despeito dos efeitos dramáticos que as mudanças orgânicas decorrentes do envelhecimento ocasionam na resposta aos medicamentos, a intervenção farmacológica é, ainda, a mais utilizada para o cuidado à pessoa idosa.

## CONCLUSÃO

Os dados da pesquisa foram obtidos através de questionários aplicados aos idosos que andavam pelas ruas do centro da cidade de Anápolis-GO. No âmbito regional, acredita-se que seja o primeiro estudo realizado nesse contexto.

De acordo com as estatísticas evidenciadas, através da pesquisa realizada, constatou-se que o uso do anti-inflamatório diclofenaco de potássio é exorbitante, principalmente pelo fato de ser comercializado de forma fracionada e pelo baixo custo de venda.

Com relação às vendas do diclofenaco de potássio mediante a apresentação de receituário médico identificou-se que a automedicação superou de forma expressiva a dispensação com receituário médico, porém alguns entrevistados apesar de não possuírem a receita médica em mãos, informavam que havia sido receitado pelo médico.

No estudo em questão, os balconistas de farmácia foram responsáveis pela maioria das indicações sem orientação médica, seguido de recomendação de outros familiares.

Dores nas costas e nas pernas demonstraram serem os maiores motivos que levaram a compra do diclofenaco de potássio pelos entrevistados.

No presente estudo, revelou-se que o anti-inflamatório não estereoidal, diclofenaco de potássio, vêm sendo consumido como medicamentos de uso rotineiro pela população, e devido a pequenos sintomas, como exemplo a cefaleia, fazem com que os indivíduos venham até as drogarias em busca desses fármacos.

Nota-se que a população idosa em Anápolis prefere em muitos casos o balconista de farmácia devido ao fácil acesso, rapidez no atendimento e compra do medicamento, em vez de procurar o médico para prescrever o receituário, pois demanda tempo e muitas vezes a consulta pelo sistema de saúde pública é demorada.

Em síntese, os resultados encontrados neste estudo evidenciam que há a necessidade de uma mudança do sistema praticado nas drogarias, nas quais atendentes sem conhecimento farmacológico pertinente realizam indicações de fármacos sem orientação do responsável técnico, fato que pode ocasionar problemas irreversíveis à saúde da população.

### AGRADECIMENTO

As autoras agradecem aos acadêmicos do quarto período do curso de farmácia da Faculdade do Instituto Brasil (FIBRA) pela colaboração para a pesquisa de campo.

### REFERÊNCIAS

1. R.E. Small, Diclofenac Sodium, *Clin. Pharm.*, **8**, 545-558 (1989).
2. V.A. Skoutakis, C.A. Carter, T.R. Mickle, Review of diclofenac and evaluation of its place in therapy as a nonsteroidal antiinflammatory agent, *Drug Intel. Clin. Pharm.*, **22**, 850-859 (1988).
3. European Pharmacopoeia, *Supplement*, p. 715-715, 2001.
4. Physicians' Desk Reference, 51st edition, Thomson PDR, 1997.
5. V. Reiner, A. Reiner, G. Reiner, M. Conti, Increased absorption rate of diclofenac from fast acting formulations containing its potassium salt, *Arzneimittelforschung*, **51**, 885-890 (2001).
6. A. Marzo, L. Dal Bo, F. Verga, N.C. Monti, G. Abbondati, R.A. Tettamanti, F. Crivelli, M.R. Uhr, S. Ismaili, Pharmacokinetics of diclofenac after oral administration of its potassium salt in sachet and tablets formulation, *Arzneimittelforschung*, **50**, 43-47 (2000).
7. W. Mcneely, K.L. Goa, Diclofenac-potassium in migraine: A review, *Drugs*, **57**, 991-1003 (1999).
8. F. Bricks, L. Silva, A.A. Clóvis, "Toxicidade dos anti-inflamatórios não hormonais", São Paulo, 2005, p. 182.
9. A. Garner, Adaptation in the pharmaceutical industry, with particular reference to gastrointestinal drugs and disease, *Scand. J. Gastroenterol.*, **27**, 83 (1992).

10. L. Martins, Medicamentos mais vendidos no Brasil. Postado em 5 mar. 2012 no Guia da Farmácia. Disponível em URL: <http://www.guiadafarmacia.com.br>. Acesso em 12 jan. 2014.
11. A.I. Loyola Filho, E. Uchoa, H.L. Guerra, J.O.A. Firmo, M.F. Lima-Costa, Prevalência e fatores associados á automedicação: resultado do projeto Bambuí, *Rev. Saúde Publ.*, **36**(1), 55-62 (2002).
12. G.M.S. Silva, A.C. Almeida, N.R.S. Mello, R.N. Oliveira, T.B. Oliveira, V.N.M. Pereira, R.O. Pinheiro, Análise da automedicação no município de Vassouras-RJ, *Infarma*, **17**(5/6), 59-62 (2005).
13. P.S.D. Arrais, H.L.L. Coelho, M.C.D.S. Batista, M.L. Carvalho, R.E. Righi, J.M. Arnau, Perfil da automedicação no Brasil, *Rev. Saúde Públ.*, **31**(1), 71-77 (1997).
14. A. Whelton, C.W. Hamilton, Nonsteroidal anti-inflammatory drugs: Effects on kidney function, *J. Clin. Pharmacol.*, **31**, 588-598 (1991).
15. L. Vogt, D. De Zeeuw, A.J.J. Woittiez, G. Navis, Selective cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibition reduces proteinúria in renal patients, *Nephrol. Dial. Transplant.*, **24**, 1182-1189 (2009).
16. W.C. Winkelmayr, S.S. Waikar, H. Mogun, D.H. Solomon, Nonselective and cyclooxygenase-2-selective NSAIDs and acute kidney injury, *Am. J. Med.*, **121**, 1092-1098 (2008).
17. M.R. Griffin, A. Yared, W.A. Ray, Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and acute renal failure in elderly persons, *Am. J. Epidemiol.*, **151**, 488-496 (2000).
18. J.A.C. Silva, A.L. Gomes, J.P.S. Oliveira, Y.A. Sasaki, B.T.B. Maia, B.M. Abreu, Prevalência de automedicação e os fatores associados entre os usuários de um Centro de Saúde Universitário, *Rev. Bras. Clin. Méd.*, **11**(1), 27-30 (2013).

## ANEXO



**FACULDADE DO INSTITUTO BRASIL - FIBRA**

**Instituto Brasil de Ciência e Tecnologia Ltda - I.B.C.T.**

BR 060/153, Km 97, nº 3400, Bairro São João, Anápolis-GO, CEP 75.133-050

Telefone: (62) 3313-3500 / 3313-2500 Site: [www.fibra.edu.br](http://www.fibra.edu.br) E-mail: [secretaria@fibra.edu.br](mailto:secretaria@fibra.edu.br)

---

## QUESTIONÁRIO

1) É fácil comprar o diclofenaco de potássio nas farmácias sem receita médica?

\_\_\_\_\_  
**Sim**

\_\_\_\_\_  
**Não**

2) Os farmacêuticos ou atendentes informam os perigos da auto medicação por idosos?

\_\_\_\_\_  
**Sim**

\_\_\_\_\_  
**Não**

3) Por que vocês tomam o diclofenaco de potássio e não outro medicamento?

4) Vocês lêem a bula do medicamento para saber sua indicação e contra-indicação?

\_\_\_\_\_  
**Sim**

\_\_\_\_\_  
**Não**

## Microencapsulación de aceite esencial de tomillo (*Thymus vulgaris*) en matrices poliméricas de almidón de ñame (*Dioscorea rotundata*) modificado

Germán Eduardo Matiz Melo<sup>1\*</sup>, Katerin Fuentes López<sup>2\*\*</sup>, Glicerio León Méndez<sup>3\*\*\*</sup>

<sup>1</sup> Grupo de Investigación en Tecnología de Productos Naturales (Tecprona), Departamento de Farmacia, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá, Cra. 30 No. 45-03, Bogotá, D. C., Colombia.

\* Autor correspondiente. Correo electrónico: gematizm@unal.edu.co.

<sup>2,3</sup> Grupo de Investigación en Tecnología Farmacéutica, Cosmética y de Alimentos (Gitfca), Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Universidad de Cartagena, Cartagena, Colombia.

Tel.: (1)3165000. Ext.: 14620.

\*\* Correo electrónico: gleonm1@unicartagena.edu.co.

\*\*\* Correo electrónico: kfuentesl@unicartagena.edu.co.

Recibido para evaluación: 20 de enero de 2015.

Aceptado para publicación: 2 de julio de 2015.

### RESUMEN

Los aceites esenciales son conocidos por sus numerosas actividades biológicas y organolépticas, pero su empleo suele verse limitado por su alta volatilidad y tendencia a degradarse. La microencapsulación es una estrategia válida para superar estos inconvenientes. En este trabajo se empleó almidón de ñame (*D. rotundata*), el cual fue sometido a procesos de hidrólisis y lipofilización, empleando anhídrido dodecenil-succínico (DDSA); esto incrementó significativamente las capacidades captadora de aceite y emulsificante (tensoactiva) del almidón nativo, el cual se empleó para microencapsular aceite esencial de tomillo, que en estudios previos demostró potente actividad antibacteriana sobre las cepas involucradas en el desarrollo del acné. La microencapsulación se llevó a cabo por microparticulación lipídica sólida, seguida de emulsificación. Esta alcanzó una eficiencia superior al 98%, y el producto obtenido, desafiado en diversas pruebas, demostró capacidad de retener más del 90% del aceite esencial en condiciones de evaporación, evitando su oxidación y el cambio en su perfil de composición. Finalmente, las microcápsulas de aceites esenciales de tomillo, al ponerse en contacto con las bacterias del acné, mantuvieron su actividad

bactericida. Los resultados de este trabajo aportan al desarrollo de formulaciones farmacéuticas, cosméticas y alimentarias estables y funcionales de aceites esenciales, al protegerlos de la evaporación y degradación.

*Palabras clave:* almidones modificados, microencapsulación, *Thymus vulgaris*, hidrólisis, lipofilización, DDSA, acné.

## SUMMARY

### Microencapsulation of thyme (*Thymus vulgaris*) essential oil in polymeric matrices based on modified yam (*Dioscorea rotundata*) starch

Essential oils are known for their numerous biological and organoleptic activities, but their use is often limited by high volatility and tendency to degrade. Microencapsulation is a valid strategy to overcome these drawbacks. In this paper starch yam (*D. rotundata*) was used, which was subjected to hydrolysis processes and lipophilization using dodecyl succinic (DDSA) anhydride, this significantly increased the scavenging capacity of oil and emulsifier (surfactant) of native starch, which was used to microencapsulate thyme essential oil, that in previous studies showed potent antibacterial activity on strains involved in the development of acne. Microencapsulation was conducted by microparticulation solid lipid, followed by emulsification. This reached an efficiency of over 98%, and the product obtained, challenged by various trials, demonstrated ability to hold more than 90% of essential oil under evaporation conditions, avoiding oxidation and change in composition profile. Finally, the microcapsules of essential oil of thyme at contact the acne bacteria, maintained its bactericidal activity. The results of this study contribute to the development of pharmaceutical, cosmetic and food formulations stable and functional based on essential oils, to protect degradation and evaporation.

*Key words:* Modified starches, microencapsulation, *Thymus vulgaris*, hydrolysis, lipophilization, DDSA, acne.



## INTRODUCCIÓN

Los aceites esenciales (AA. EE.) son mezclas complejas de sustancias químicas biosintetizadas fundamentalmente por las plantas, que les proporcionan su aroma característico. Muchos poseen actividades biológicas reconocidas como antisépticas, antiinflamatorias y repelentes de insectos, entre otras, amén de que otros son empleados como sazoadores. Con gran frecuencia, dichas propiedades no se aprovechan plenamente debido a su gran volatilidad y tendencia a oxidarse [1], por lo cual es necesario fijarlos a un transportador para proporcionarles una adecuada estabilidad y vida útil. Una de las mejores alternativas para llevar a cabo esto es la microencapsulación, para lo cual pueden emplearse biopolímeros de origen natural [2-5]. Generalmente, los materiales de pared usados para microencapsulación son goma arábica, maltodextrina, carbometilcelulosas y almidón [6].

Colombia, dentro de su gran riqueza natural, posee numerosas fuentes de almidones nativos que han sido muy poco estudiados para fines no alimentarios. Estudios previos [7] permitieron desarrollar una serie de almidones lipofílicos a partir de fuentes propias de las regiones Caribe y Andina (ñame, batata, yuca, plátano, maíz, arracacha, achira, arroz, etc.), que probaron una importante capacidad emulsificante. Estos almidones, mediante procedimientos microtecnológicos posteriores son capaces de encapsular eficientemente AA. EE., con potenciales aplicaciones farmacéuticas, cosméticas y alimentarias. La microencapsulación se realiza empleando numerosos procesos [6, 8, 9], entre ellos el secado por aspersión o *Spray Drying*, la coacervación, formación de liposomas, entre muchos otros. Según las condiciones de elaboración y el tipo de material encapsulante, es posible obtener materiales capaces de retener AA. EE. y liberarlos en el momento de su uso. Estos productos pueden ser empleados como transportadores de aceites esenciales capaces de brindar protección a los mismos frente a la oxidación, la evaporación y el mantenimiento de su perfil cromatográfico, así como el control de su liberación.

## MATERIALES Y MÉTODOS

*Reactivos y solventes:* el etanol se adquirió de JT Baker (Phillipsburg, USA), anhídrido docecenil succínico caldo de Sigma-Aldrich (Saint Louis, USA). Medios de cultivo: Müller Hinton (caldo MH), agar Müller Hinton (agar MH), caldo Tripticasa Soya (caldo TSA), agar Tripticasa Soya (agar TSA), caldo Lutia Bertani (caldo LB) y agar Lutia Bertani (agar LB) se obtuvieron de Merck KGaA (Darmstadt, Alemania), gentamicina sulfato de Biopex SAC (estándar secundario lote: 10C256). Las cepas

bacterianas se adquirieron de la American Type Culture Collection (ATCC): *Propionibacterium acnes* (*P. acnes*) ATCC 11827, *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) ATCC 25923 y *Staphylococcus epidermidis* (*S. epidermidis*) ATCC 12228. El aceite esencial de tomillo (*Thymus vulgaris* L.) se obtuvo en Green Andina Ltda. (Bogotá, Colombia).

El almidón de ñame (*Dioscorea rotundata*, var. espino) se obtuvo de tubérculos del mismo que se compraron en el municipio de San Juan Nepomuceno, norte del departamento de Bolívar (9° 37' latitud norte y 74° 15' longitud oeste), a 72 km de la ciudad de Cartagena. Se adquirieron en la parcela de un particular, 20 kilogramos de material vegetal fresco, entero, sin señales de deterioro y en estado de madurez para consumo humano. El proceso de extracción del almidón corresponde al método convencional de rallado y precipitación [10]. Inicialmente, con un lavado se retira la tierra y suciedad en general, seguido de un descortezado y nuevo lavado; luego se realiza un troceado y licuado con agua potable para obtener una lechada, esta se filtra por medio de una tela para eliminar las fibras de celulosa. El filtrado se deja en reposo y luego se decanta, el sobrenadante se elimina y el sedimento se lava con agua desionizada y se filtra al vacío, se seca a 50 °C por 24 horas, luego se muele y finalmente se empaca en recipientes herméticos. Aproximadamente un 10% de almidón seco es obtenido a partir del material vegetal, es decir, 2 kilogramos.

### Caracterización del almidón

*Contenido de amilosa:* se disolvieron 20 mg de almidón (base seca) en 8 mL de dimetilsulfóxido (DMSO) al 90%, se agitó vigorosamente en un Vórtex por 20 minutos y posteriormente se calentó la dispersión en un baño de maría Memmet a 85 °C por 15 minutos. En seguida se enfrió la mezcla y se aforó a 25 mL con agua destilada. Se tomó 1 mL de esta dispersión y se transfirió a un matraz aforado de 50 mL, al cual se le había agregado 40 mL de agua destilada y 5 mL de una solución de yodo/yoduro de potasio (0,0025 M - 0,0065 M). Finalmente se aforó con agua, se homogenizó y se dejó en reposo por 15 minutos antes de leer en el espectrofotómetro a 630 nm, usando una curva patrón de almidón soluble (amilosa) estandarizado para la realización de los cálculos [11, 12].

*Determinación de pH:* se preparó una suspensión de 10 g de almidón en un vaso de precipitado de 100 mL y se adicionaron 50 mL de agua destilada, en agitación constante a una rata moderada por 5 minutos. Se determinó el pH empleando un potenciómetro previamente calibrado [13].

*Tamaño de partícula:* el tamaño medio de partícula se determinó según metodología de Edmundson [14]. Para la medición de las partículas se empleó un estéreo-microscopio NIKON SMZ745T (lente de 5X). Muestras muy pequeñas de almidón se pusieron sobre portaobjetos que posteriormente eran ubicados en la platina del equipo. Se

observó la morfología, tamaño y bordes de las partículas para cada almidón y se tomaron varias fotografías. De cada una se escogieron 20 partículas que fueron analizadas y medidas empleando el programa OPTKO-PRO versión 2.7. Un mínimo de 200 partículas se analizaron por muestra.

### Modificación química del almidón

*Hidrólisis:* a una suspensión de almidón nativo (40 g de almidón en 100 mL de agua desionizada) se añadió ácido clorhídrico hasta alcanzar una proporción de 3,4 g respecto de la base seca, con agitación constante por 6 horas; manteniendo la temperatura en 50 °C en un baño termostataado. Cumplido el tiempo, se neutralizó el sistema con NaOH al 10% hasta pH 6,5; se filtró al vacío y el residuo se lavó 4 veces con agua destilada, se secó a 50 °C por 24 horas y finalmente el almidón hidrolizado obtenido se molió y almacenó en bolsas plásticas herméticas hasta su uso [15].

*Lipofilización:* una suspensión de almidón nativo o hidrolizado a 25 °C (40 g de almidón en 100 mL de agua desionizada), se ajustó a pH 8,5 con NaOH 3% con agitación constante por 30 minutos. En ensayos independientes se agregaron 10 o 15 mL de anhídrido dodecenil succínico (DDSA) diluido en 75 mL de etanol 96%, para alcanzar dos niveles diferentes de sustitución. Debido a que durante la reacción el pH de la solución tiende a descender, este se mantuvo entre 8,5 y 9,0 con pequeñas adiciones de NaOH 3%. Una vez que el reactivo límite se terminó, esto es, cuando el pH no desciende más, la solución se ajustó a un valor de 6,5 con HCl al 10%. El material se filtró a vacío y se resuspendió en agua desionizada para nuevamente ser filtrado. Esta operación se repitió por tres veces. Finalmente se dispuso en capas delgadas sobre bandejas y se secó en un horno de laboratorio (Mettler SNE 400) a 50 °C por 24 horas [16].

Para garantizar la remoción total del ácido dodecenil succínico libre, los almidones lipofilizados se sometieron a un lavado con ayuda de un extractor Soxhlet empleando 300 mL de etanol al 96% como solvente, y un mínimo de 10 recirculaciones; luego, el almidón fue filtrado y secado durante 24 horas a 50 °C.

*Determinación del porcentaje de sustitución (PS):* el PS representa el número promedio de grupos hidroxilos sustituidos por mol de anhidroglucosa (AG) [17]. El PS de los almidones succinatados se determinó por titulación ácido-base, toda vez que el residuo de ácido dodecenil succínico unido a la cadena de almidón, posee un grupo carboxilo libre. Se pesaron 5 g de almidón modificado en un vaso de precipitado de 50 mL, a los que se adicionaron 25 mL de solución de HCl 0,01 N; para asegurar que los residuos se encontraran protonados (remineralización). Esta suspensión se agitó durante 30 minutos. La suspensión se filtró y la torta húmeda se lavó con agua desionizada hasta que no se detectaron cloruros en las aguas de lavado (utilizando solución de  $\text{AgNO}_3$

0,1 N). La torta húmeda se transfirió cuantitativamente a un vaso precipitado de 900 mL, añadiendo 100 mL de agua desionizada con posterior agitación. A continuación se incorporaron 200 mL de agua desionizada a ebullición. La solución se colocó en un baño de agua hirviendo durante 30 minutos, después de enfriada, y con adición de 2-3 gotas de fenolftaleína al 1% como indicador, se tituló con NaOH 0,01 N. El PS se calculó mediante la siguiente ecuación:

$$\%PS = \frac{C \times V \times 162}{W \times 1000 \times 3} \times 100$$

Donde:

$C$  = normalidad de la solución de NaOH utilizado durante la titulación.

$V$  = volumen consumido de la solución de NaOH.

$W$  = peso de la muestra analizada.

162 es el peso molecular de la unidad AG.

3 es el número de hidroxilos presentes en cada unidad de AG.

### **Propiedades de los almidones modificados**

*Absorción de aceite:* este ensayo mide el cambio en la capacidad de los almidones modificados para absorber aceite. Para determinarla, se tomó 1 g de almidón y se mezcló con 10 mL de aceite de maíz en Vórtex durante 30 segundos. Las muestras se dejaron en reposo durante 30 minutos a una temperatura ambiente ( $25 \pm 2$  °C). Luego se centrifugaron a 3.000 rpm durante 15 minutos, midiéndose el volumen del sobrenadante obtenido en una probeta de 10 mL. Los resultados se obtuvieron restando los 10 mL iniciales de aceite con el volumen después de la centrifugación, reportándose la capacidad de absorción de aceite en mL/g de muestra [18].

*Absorción de agua:* este ensayo es homólogo al anterior, pero orientado a la absorción o captación de agua, y se desarrolla de manera similar a la prueba de absorción de aceite, pero empleando agua en su lugar. Los resultados se obtuvieron restando los 10 mL iniciales de agua con el volumen de la misma después de la centrifugación. Se reporta la capacidad de absorción de agua en mL/g de muestra [18].

*Capacidad emulsificante:* los almidones tienen capacidad anfifílica frente al agua y el aceite, pero escaso poder tensoactivo. Al lipofilizar los almidones, esta propiedad cambia y debe ser evaluada. Para ello se mezcló 1 g de almidón con 25 mL de agua a

25 °C, agitándose manualmente durante 15 minutos; posteriormente se mezcló esta suspensión con 25 mL de aceite de maíz con ayuda de un homogenizador ultra turrax IKA T10 a 1.300 rpm por 3 minutos y se dejó en reposo a temperatura ambiente por 24 horas, al cabo de las cuales, se midió la cantidad de emulsión remanente (ER). Esta se expresó en términos de porcentaje, como volumen de la capa emulsificada (VCE) con respecto al total del líquido (VTL) empleando la siguiente expresión [19]:

$$ER = \frac{VCE}{VTL} \times 100$$

### Microencapsulación de aceites esenciales

La microencapsulación se realizó mediante microparticulación lipídica sólida (MLS). Se tomaron 15 g de almidón (nativo, hidrolizado, lipofilizado), y se mezclaron manualmente en un vaso de precipitado con ayuda de una varilla de vidrio en seco con 3,2 g de aceite esencial disueltos en 3,2 g de aceite mineral, dejando en reposo por 24 horas en un frasco de cierre hermético. Al cabo de este tiempo, se añadieron 50 mL de agua desionizada, y la mezcla resultante se sometió a emulsificación con ayuda de un homogenizador ultra turrax IKA T10 a 5.000 rpm por 10 minutos. El producto obtenido se almacenó emulsionado en frascos herméticos y así se empleó.

### Eficiencia de la encapsulación

Para evaluar la eficiencia de la encapsulación se empleó un equipo de hidrodestilación tipo Clevenger, en el que se pusieron 20 g de emulsión de microencápsulas en 300 mL de agua desionizada en un balón de 500 mL. Después de destilar por 3 horas, se cuantificó el aceite esencial obtenido, el cual corresponde a un porcentaje de material inicial [20].

### Análisis de composición del aceite esencial

La composición del aceite esencial de tomillo se analizó mediante técnica instrumental de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masa (GC/MS), en un equipo GC/MS 7890A/5975C Agilent (USA), en interfase con un detector selectivo de masas HP5973 Network conectado en línea con un sistema HP-MS ChemStation y la base de datos NIST-2008. Condiciones: como muestra se tomaron 50  $\mu$ L de cada aceite esencial que se disolvieron en 450  $\mu$ L de diclorometano, inyectándose 1,0  $\mu$ L a modo split (20:1), la temperatura inyector fue de 250 °C, se utilizó una columna capilar HP-5MS 5% Phenyl Methyl Silox (30 m  $\times$  250  $\mu$ m  $\times$  0,25  $\mu$ m), utilizándose helio (Aga-Fano) como gas de arrastre, a flujo constante de 1 mL/min, presión del gas 7,6354 psi y velocidad lineal de 36 cm/seg. La temperatura inicial fue de 45 °C y la temperatura de la línea de transferencia de 280 °C [21, 22]. La identidad de los compo-

nentes se asignó por comparación de los espectros de masas obtenidos con los presentes en la base de datos.

### **Actividad antibacteriana *in vitro***

La actividad antibacteriana del aceite esencial de tomillo microencapsulado en el almidón lipofilizado de ñame, se realizó de la manera que se describe a continuación.

Cepas de *S. aureus*, *S. epidermidis* y *P. acnes* se inocularon en caldos MH, LB, TSA, respectivamente, de acuerdo con las indicaciones establecidas por la CLSI [23], tomando entre 3 y 4 colonias bien diferenciadas y morfológicamente similares de las bacterias previamente sembradas en placas de Petri con agares homólogos, incubándose a  $35 \pm 2$  °C y verificando sistemáticamente la densidad óptica a 620 nm ( $DO_{620}$ ) en lector de microplacas (Multiscan EX Thermo®, USA), hasta que la suspensión bacteriana alcanzara una  $DO_{620}$  entre 0,08 y 0,1 equivalente a 0,5 en la escala de McFarland ( $1 \times 10^8$  UFC/mL) [24]. Una vez alcanzado este valor, 5 mL de caldo se mezclaron con 5 mL de emulsión de microcápsulas empleando un agitador Vórtex, en tubos de ensayo microbiológico con tapa estériles, dejándose en incubación por 24 horas a  $35 \pm 2$  °C en agitación constante. Finalizado este tiempo, y para evaluar la capacidad bactericida de las microcápsulas, asadas tomadas de los tubos se sembraron en los agares específicos para las tres cepas y nuevamente se incubaron a las mismas condiciones por 24 horas.

### **Análisis estadístico**

Los resultados obtenidos para cada uno de los almidones bajo estudio, fueron recolectados y comparados mediante evaluación estadística según los comportamientos observados para materiales de referencia tales como el almidón de maíz. Todos los ensayos se realizaron por triplicado siguiendo los protocolos establecidos anteriormente. El análisis estadístico se realizó comprobando los supuestos de normalidad de datos para el empleo de modelos paramétricos (distribución normal, igualdad de varianza e independencia de datos). El análisis estadístico se orientó a comparar los valores de medios de los resultados obtenidos. Los resultados obtenidos fueron sometidos a análisis de varianza ANOVA, seguido de la prueba de Dunnet para determinación de diferencias significativas. Los datos se ordenaron empleando el programa MS Excel 365, y los análisis estadísticos se hicieron con el paquete GraphPad Prisma V 5.0.

## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

Los ensayos se realizaron sobre almidones nativos y modificados de ñame (*D. rotundata*). Se emplearon almidones homólogos de maíz USP (*Z. mays*), como referencia.

La tabla 1 presenta los resultados de la caracterización básica de los almidones de ñame y maíz. El valor de pH para cada uno se encontró dentro de los límites esperados de 5,5 a 7,5 [25]. De igual manera, tanto el tamaño de partícula como el contenido de amilosa se corresponden con los valores reportados por la literatura [2, 12, 26, 27]. La figura 1 presenta una imagen de los amiloplastos de ñame con la forma en que se hicieron las medidas.

Tabla 1. Caracterización almidones nativos de ñame y maíz.

Almidón	Amilosa (%)	pH	Tamaño de partícula ( $\mu\text{m}$ )
Ñame	$35,00 \pm 0,54$	$7,19 \pm 0,04$	$126,57 \pm 17,17$
Maíz USP	$25,97 \pm 0,59$	$6,57 \pm 0,04$	$38,63 \pm 6,25$

Los valores corresponden a media de tres réplicas  $\pm$  la desviación estándar.

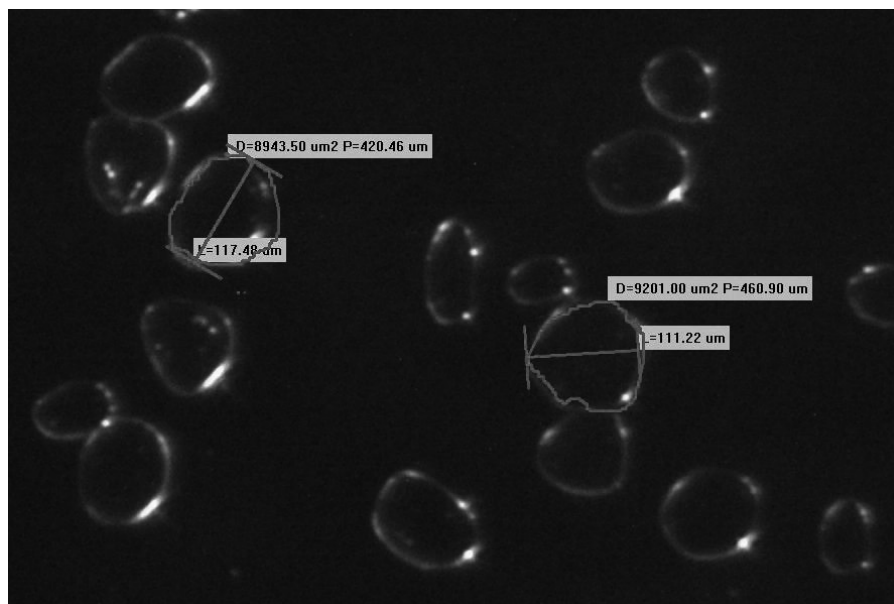


Figura 1. Fotografía de amiloplastos de ñame, con mediciones hechas con el programa OPTKO-PRO versión 2.7.

Una micropartícula lipídica sólida se asimila a una emulsión del tipo agua en aceite, excepto que la parte lipídica se mantiene sólida [28]. La microencapsulación de aceites esenciales empleando almidones, utiliza los amiloplastos como microcontenedores, ajustándose a esta definición. El objetivo, por tanto, es “rellenar” los amiloplastos

individuales con aceite esencial en una matriz sólida, para lo que se necesitan dos cosas: incrementar la lipofilidad y conservar la integridad del amiloplasto para que retenga al aceite. Numerosos estudios se centran hoy en la preparación de este tipo de micro-partículas para vehiculizar y proteger los AA. EE. [29-33].

La lipofilización de los almidones para hacerlos más afines a los aceites esenciales se puede lograr de varias maneras. La primera, es realizando una hidrólisis ácida parcial del almidón. Zambrano y Camargo [15] optimizaron las condiciones de dicha hidrólisis sobre almidón de yuca (*Manihot esculenta*), como sustituto de grasas en alimentos procesados. Consecuencia de la hidrólisis, ocurre un incremento en la lipofilidad del material resultante, junto con una disminución significativa de la viscosidad de sus dispersiones. La segunda, consiste en introducir grupos lipofílicos a las cadenas poliméricas del almidón. Una forma de hacerlo, es mediante reacciones de sustitución con anhídridos orgánicos de cadenas carbonadas largas. En este trabajo se empleó anhídrido dodecenil succínico, el cual tiene una cadena de doce carbonos. La tabla 2 presenta los porcentajes de sustitución alcanzados a los dos niveles de cantidad de reactivo empleado. En todos los casos se utilizaron almidones hidrolizados. Almidones nativos no se sustituyeron debido a que sus dispersiones son muy viscosas.

Tabla 2. Porcentaje de sustitución de los almidones hidrolizados y lipofilizados según las condiciones de reacción (mL de anhídrido dodecenil succínico por cada 40 gramos de almidón).

Almidón	DDSA 10 mL	DDSA 15 mL
Ñame	0,33 ± 0,00	0,40 ± 0,00
Maíz	0,34 ± 0,00	0,40 ± 0,00

Los valores corresponden a media de tres réplicas ± la desviación estándar.

Como consecuencia de la hidrólisis y la sustitución lipofílica, los almidones presentaron cambios en la capacidad captadora de aceite, cuyos valores se presentan en la figura 2. Es notable para ambos almidones, que en la medida que se hidroliza y sustituye con DDSA, la lipofilidad aumenta, llegando a duplicarse con la mayor sustitución.



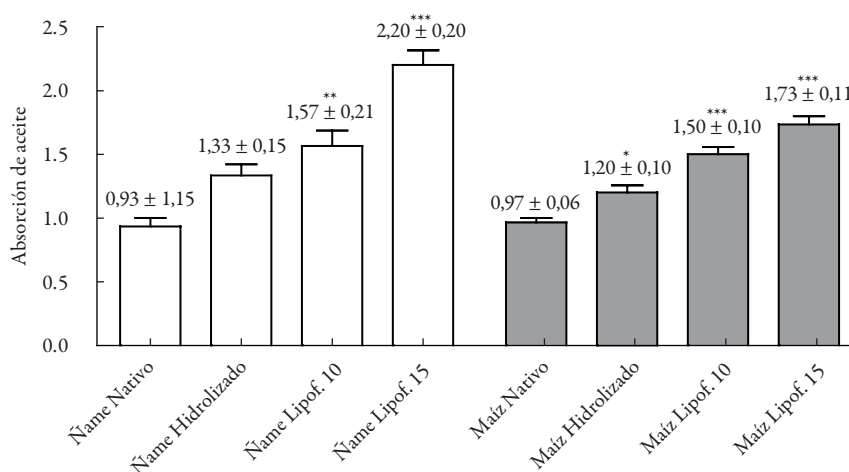


Figura 2. Capacidad de absorción de aceite de los almidones nativos y modificados (mL/g). Los valores corresponden a las medias de tres réplicas  $\pm$  desviación estándar de los almidones modificados respecto de su almidón nativo (control). \* $p < 0,5$ ; \*\* $p < 0,01$  y \*\*\* $p < 0,001$  son significativamente diferentes del valor de control.

Un comportamiento un poco más errático se verifica con la capacidad de captación de agua (véase figura 3). El ñame tiende a reducir esta capacidad a medida que se lipofiliza, en tanto que en el maíz, con la hidrólisis y primera sustitución, esta se aumenta, mientras que con la segunda sustitución se disminuye. Esto puede deberse al hecho de que con las primeras modificaciones ocurre una desorganización de las cadenas poliméricas, lo que permite una mayor entrada de agua al amiloplasto. Con el segundo nivel de sustitución, este se hace más hidrorrepelente y, por tanto, su capacidad de captar agua disminuye. Por tener un tamaño de partícula más pequeño que el ñame, la desorganización de las cadenas es más probable.

Los almidones son anfífilicos en su estado natural (nativo), pero con una pobre capacidad emulsificante, pues su actividad tensoactiva es muy limitada; no obstante, como se observa en la figura 4, en la medida que los almidones se sustituyen con cadenas carbonadas largas, la capacidad tensoactiva, y por tanto emulsificante, se incrementa [28, 29, 34]. El balance hidrofílico-lipofílico (HLB) de los almidones obtenidos probablemente tienda a ser bajo, puesto que las emulsiones que se forman en el ensayo de capacidad emulsificante fueron del tipo agua en aceite (W/O).

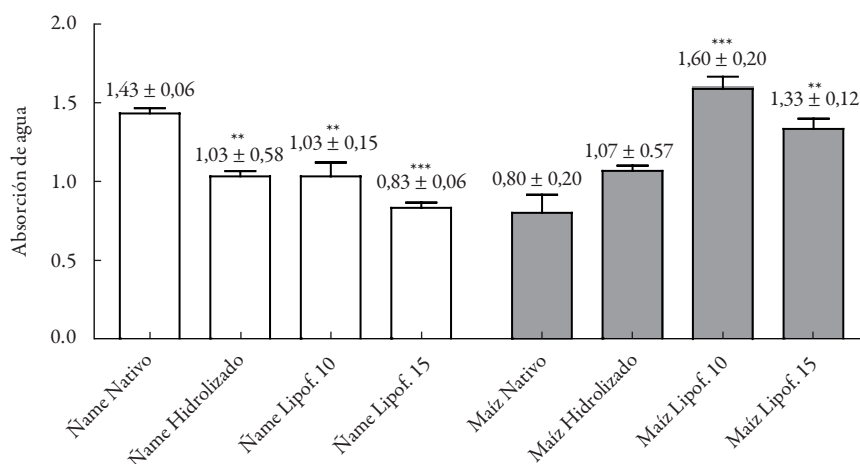


Figura 3. Capacidad de absorción de agua de los almidones nativos y modificados (mL/g). Los valores corresponden a las medias de tres réplicas  $\pm$  desviación estándar de los almidones modificados respecto de su almidón nativo (control). \*\* $p < 0,01$  y \*\*\* $p < 0,001$  son significativamente diferentes del valor de control.

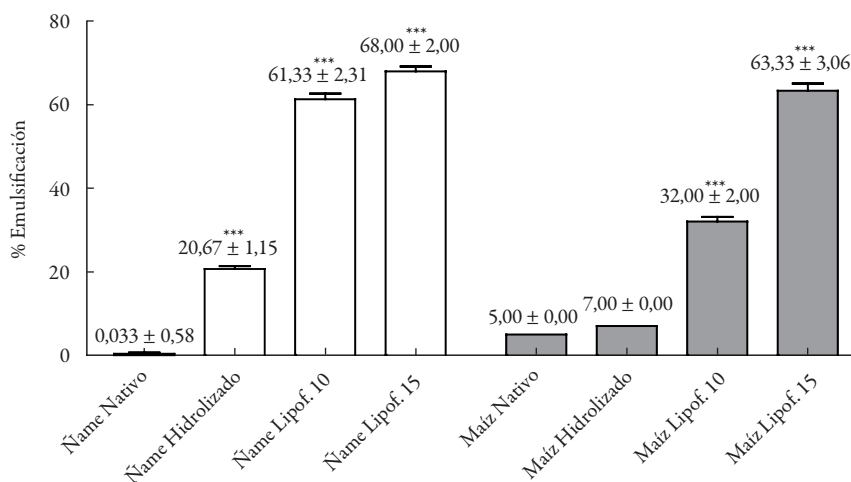


Figura 4. Porcentaje de emulsión remanente (24 horas) empleando almidones nativos y modificados. Los valores corresponden a las medias de tres réplicas  $\pm$  desviación estándar de los almidones modificados respecto de su almidón nativo (control). \*\*\* $p < 0,001$  es significativamente diferente del valor de control.

Para la encapsulación del aceite esencial de tomillo, se escogió el almidón de ñame hidrolizado/lipofilizado, que mostró la mayor capacidad tanto lipofílica como emulsificante.

La absorción del aceite esencial en la matriz lipofílica rinde un material de aspecto seco, que se embebe fácilmente sin ser grasoso al tacto. El propósito de suspender/emulsificar estas partículas, se orienta la formación de una cubierta acuosa alrededor de las mismas, que por hidrorrepelencia, ayude a mantener al aceite esencial dentro de las microcápsulas de almidón modificado, que como se indicó previamente, corresponden a los amiloplastos nativos originales. La emulsión obtenida, correspondió a una de tipo aceite en agua (O/W), sin sensación grasosa y de fácil lavado, lo que permite concluir que al incrementar la proporción de agua en la emulsión mediada por estos almidones lipofílicos, ocurre una inversión de fases.

Para evaluar la capacidad de las microcápsulas de retener el aceite esencial, se tomaron 10 cuerpos de cajas de Petri, donde se vertieron 20 mL de emulsión, que se dejaron expuestas al ambiente (temperatura  $25 \pm 2$  °C, HR 60%) durante 20 días, evaluando por triplicado de manera seriada. La figura 5 presenta los resultados. El día cero, corresponde a la composición inicial de la preparación, donde se pone de manifiesto que la eficiencia de la encapsulación es mayor del 98,5%. Al día 4, se ha perdido cerca del 77% del agua, pero apenas un 3,2% de aceite esencial. Para el día 20, hay un remanente del 15% de humedad, y más del 91% de aceite, es decir, una pérdida del 7%. Estos resultados ponen de manifiesto la eficiencia del sistema de retener el componente volátil bajo las condiciones extremas de libre evaporación.

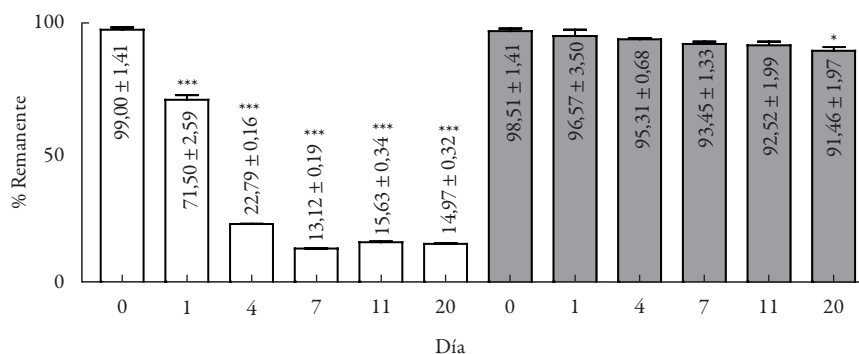


Figura 5. Porcentaje remanente de agua y aceite esencial de tomillo en un envejecimiento de 20 días, respecto de la composición original. Las barras blancas corresponden al contenido de agua y las barras grises al contenido de aceite esencial de tomillo. Los valores corresponden a las medias de tres réplicas  $\pm$  desviación estándar de los almidones modificados respecto de su almidón nativo (control). \* $p < 0,5$  y \*\*\* $p < 0,001$  son significativamente diferentes del valor de control.

Dado que los objetivos de la microencapsulación de los aceites esenciales no es solo retenerlos sino también mantener su composición invariable, evitando oxidaciones,

polimerizaciones y otras reacciones degradativas, se realizaron análisis de cromatografía GM a los destilados anteriores. Los perfiles de composición durante el envejecimiento se presentan en la tabla 3. De los principales componentes, se destaca que el timol se reduce en un 10%, en tanto que el carvacrol lo hace en un 1%, que es consistente con la pérdida global del 7% de aceite, y no se evidencia la aparición de nuevas especies químicas, lo que significa que hubo una pequeña pérdida de material, pero no se evidenció deterioro de los componentes constitutivos.

El aceite esencial de tomillo (*T. vulgaris*), ha demostrado ser muy promisorio para el tratamiento del acné, gracias a sus propiedades antibacterianas sobre las cepas vinculadas a la fase infectiva del mismo (*P. acnes*, *S. epidermidis*, *S. aureus*) [29, 30, 35]; por tal razón, fue elegido como aceite modelo. Para probar si sus propiedades bactericidas se mantenían aún después de encapsulado, se evaluó la emulsión del mismo frente a las cepas de acuerdo con la metodología descrita. En el modelo empleado, se evidenció que por efecto de la dilución, la emulsión deja de ser propiamente líquida, las microcápsulas quedan en suspensión, de allí la necesidad de la agitación constante.

Tabla 3. Perfil de composición de los principales componentes del aceite esencial de tomillo durante el envejecimiento de la emulsión.

Compuesto	Tiempo de retención (min)	Abundancia relativa					
		Día 0	Día 1	Día 4	Día 7	Día 11	Día 20
$\alpha$ -Pinoeno	4,38 $\pm$ 0,01	0,74	0,84	0,85	1,03	0,87	0,95
Canfeno	4,67 $\pm$ 0,00	0,62	0,76	0,76	0,88	0,67	0,73
p-Cimeno	6,50 $\pm$ 0,04	15,55	16,45	17,69	18,90	17,28	20,3
Eucaliptol	6,65 $\pm$ 0,07	1,52	1,81	1,82	1,87	1,94	1,50
g-Terpineno	7,52 $\pm$ 0,02	5,47	5,48	5,65	6,30	5,81	7,79
Linalool	8,55 $\pm$ 0,02	1,80	2,31	2,05	1,91	2,59	1,73
Canfor	9,56 $\pm$ 0,00	0,23	0,21	0,27	0,29	0,32	0,44
Borneol	10,45 $\pm$ 0,01	0,96	1,29	1,15	1,03	1,45	0,86
Terpinen-4-ol	10,84 $\pm$ 0,01	0,76	1,12	0,91	0,84	1,19	0,73
Timol	14,37 $\pm$ 0,06	63,46	62,13	61,77	61,71	58,29	51,48
Carvacrol	14,47 $\pm$ 0,07	12,48	10,07	11,23	11,05	13,11	11,12
o-Cimen-5-ol	14,61 $\pm$ 0,05	1,11	1,28	0,21	0,18	1,44	0,17
Cariofileno	18,01 $\pm$ 0,02	2,38	1,66	1,60	2,11	1,44	2,19
Óxido de cariofileno	21,67 $\pm$ 0,04	0,71	0,84	0,91	0,10	0,11	0,36

La figura 6 corresponde a las imágenes de las cajas de Petri donde se sembraron asadas de la mezcla de cepas con la emulsión del aceite microencapsulado. La parte A de la figura corresponde al control, y la parte B al ensayo con aceite. Se evidencia que no hubo ningún crecimiento, y que por tanto, el aceite esencial se liberó suficientemente, para ser eficaz frente al crecimiento de las bacterias.

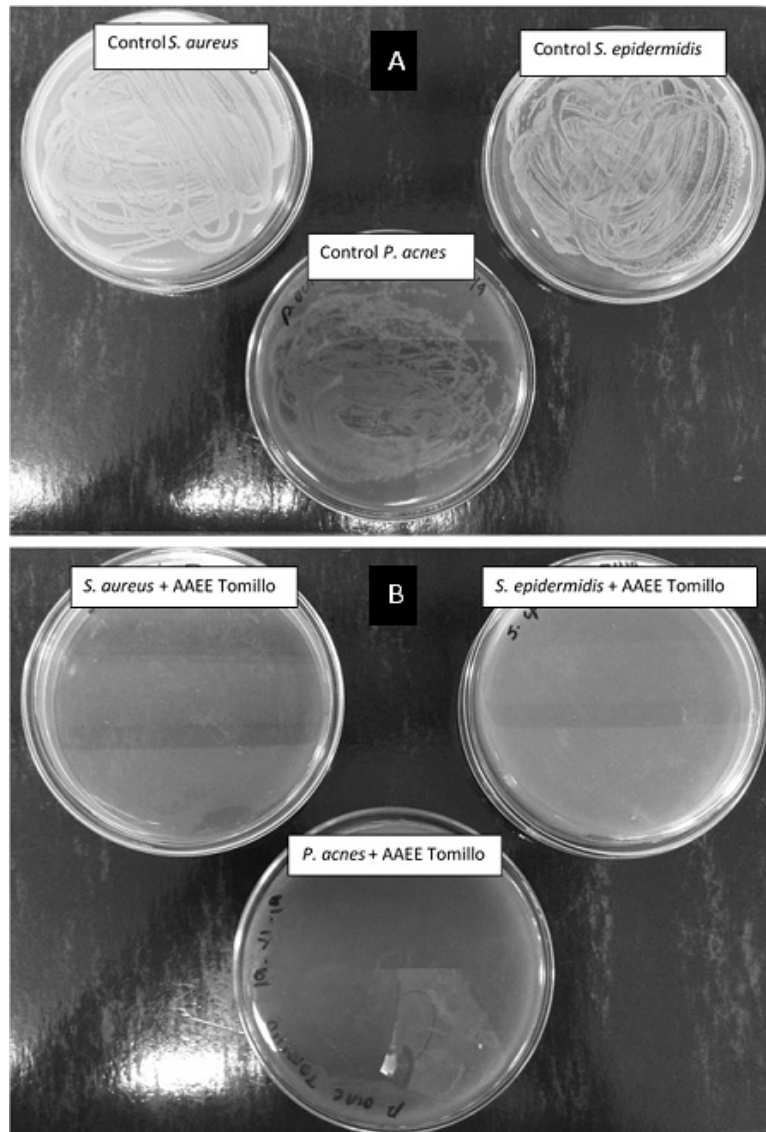


Figura 6. Imágenes de las cajas de Petri de la siembra final en la prueba de actividad bactericida.

## CONCLUSIONES

La hidrólisis y posterior lipofilización del almidón de ñame (*D. rotundata*), permite la microencapsulación de aceite esencial de tomillo (*T. vulgaris*) con una eficiencia mayor al 98%, en donde el amiloplasto nativo original se constituye en un microrreservorio de este aceite. Su posterior emulsificación lo estabiliza y lo mantiene confinado, aislado del oxígeno y la luz, elementos importantes en la degradación de estos materiales. No obstante lo anterior, al ser aplicado en un sistema diluido, las microcápsulas se liberan de la emulsión y, a su vez, liberan el aceite, virtualmente intacto, que mantiene y ejerce sus actividades biológicas conocidas.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a Colciencias por el apoyo recibido para el desarrollo de este trabajo, por sus programas de apoyo a jóvenes investigadores e innovadores, y por la ayuda integral en el marco de la convocatoria 521 de 2010. Igualmente, a la Universidad de Cartagena y la Universidad Nacional de Colombia sede Bogotá, por facilitar espacio, recursos y tiempo de los investigadores.

## REFERENCIAS

1. C. Turek, F.C. Stintzing, Impact of different storage conditions on the quality of selected essential oils, *Food Research International*, **46**(1), 341-353 (2012).
2. R. Acosta, El cultivo del maíz, su origen y clasificación. El maíz en Cuba, *Cultivos tropicales*, **30**(2), 113-120 (2009).
3. R.V. de Barros Fernandes, S.V. Borges, D.A. Botrel, Gum arabic/starch/malto-dextrin/inulin as wall materials on the microencapsulation of rosemary essential oil, *Carbohydrate polymers*, **101**, 524-532 (2014).
4. C. Dima, M. Cotârlet, P. Alexe, S. Dima, Microencapsulation of essential oil of pimiento [*Pimenta dioica* (L) Merr.] by chitosan/k-carrageenan complex coacervation method, *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, **22**, 203-211 (2014).
5. E.A. Soliman, A.Y. El-Moghazy, M.M. El-Din, M.A. Massoud, Microencapsulation of essential oils within alginate: Formulation and *in vitro* evaluation of antifungal activity, *Journal of Encapsulation and Adsorption Sciences*, **3**(1), 48-55 (2013).

6. J.E. Camacho, L.F. Villamizar, M.I. Gómez, Selección de un sistema de atomización para la formación de micropartículas de Eudragit® S100 en lecho fluido, *Nova*, **8**(13), 87-100 (2010).
7. G. Matiz, M. Osorio, G. León, Lipofilización de almidones nativos como posibles agentes emulsificantes en cosméticos, *Arte y Ciencia Cosmética*, **56**, 25-39 (2013).
8. Y. Yeo, N. Baek, K. Park, Microencapsulation methods for delivery of protein drugs, *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, **6**(4), 213-230 (2001).
9. M. Lopretti, F. Barriero, I. Fernandes, A. Damboriarena, C. Ottati, A. Olivera, Microencapsulación de compuestos de actividad biológica, *INNOTEC*, **2**(2), 19-23 (2007).
10. J. Aristizábal, T. Sánchez, D. Mejía Lorío, "Guía técnica para producción y análisis de almidón de yuca", Boletín de Servicios Agrícolas 163, FAO Editor, Roma, 2007.
11. R. Hoover, W. Ratnayake, Determination of total amylose content of starch, *Current protocols in food analytical chemistry*, E2.3.1-E2.3.5 (2001).
12. C.R.V. Tovar, El ñame espino (*Dioscorea rotundata* Poir.): una opción en la producción de jarabes edulcorantes intermedios para la industria alimentaria, *Agraria y Ambiental*, **2**(1), 19-28 (2010).
13. USP36. The United States Pharmacopeial Convention. Rockville, 2012.
14. P. Sinko, "Martin's Physical pharmacy and pharmaceutical sciences", Lippincott, Williams and Wilkinson, Baltimore, 2006.
15. F. Zambrano, C. Camargo, Otimização das condições de hidrólise ácida de amido de mandioca para obtenção de substituto de gordura, *Brazilian Journal of Food Technology*, **4**, 147-154 (2001).
16. Y. Jeon, A. Lowell, R. Gross, Studies of starch esterification: Reactions with alkenylsuccinates in aqueous slurry systems, *Starch - Stärke*, **51**(2-3), 90-93 (1999).
17. L. Bello, S. Contreras, R. Romero, J. Solorza, A. Jiménez, Propiedades químicas y funcionales del almidón modificado de plátano *Musa paradisiaca* L. (var. Macho), *Agrociencia*, **36**(2), 169-180 (2002).
18. S. Chaparro, J. Gil, I. Aristizábal, Efecto de la hidratación y la cocción en las propiedades físicas y funcionales de la harina de vitabosa (*Mucuna deeringiana*), *Vitae*, **18**(2), 133-143 (2011).

19. M. Granito, M. Guerra, A. Torres, J. Guinand, Efecto del procesamiento sobre las propiedades funcionales de *Vigna sinensis*, *Interciencia*, **29**(9), 521-526 (2004).
20. B. Murúa, C. Beristain, F. Martínez, Preparation of starch derivatives using reactive extrusion and evaluation of modified starches as shell materials for encapsulation of flavoring agents by spray drying, *Journal of Food Engineering*, **91**(3), 380-386 (2009).
21. S. Baharum, M. Bunawan, M. Ghani, W. Mustapha, N. Noor, Analysis of the chemical composition of the essential oil of *Polygonum minus* Huds. using two-dimensional gas chromatography-time-of-flight mass spectrometry (GC-TOF MS), *Molecules*, **15**(10), 7006-7015 (2010).
22. G.T. Tomy, G.A. Stern, D.C. Muir, A.T. Fisk, C.D. Cymbalisky, J.B. Westmore, Quantifying C10-C13 polychloroalkanes in environmental samples by high-resolution gas chromatography/electron capture negative ion high-resolution mass spectrometry, *Analytical Chemistry*, **69**(14), 2762-2771 (1997).
23. CLSI. "Normas para realizar las pruebas de sensibilidad a los antimicrobianos con discos". Pennsylvania: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2009.
24. S. Sutton, Measurement of cell concentration in suspension by optical density, *Pharmaceutical Microbiology Forum Newsletter*, **12**(8), 3-13 (2006).
25. A.M. Rincón, B. Rached, L.E. Aragoza, F. Padilla, Efecto de la acetilación y oxidación sobre algunas propiedades del almidón de semillas de fruto de pan (*Artocarpus altilis*), *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, **57**(3), 287-294 (2007).
26. D. Kuakpetoon, Y.-J. Wang, Structural characteristics and physicochemical properties of oxidized corn starches varying in amylose content, *Carbohydrate Research*, **341**(11), 1896-1915 (2006).
27. V. González, E. María, El ñame (*Dioscorea* spp.). Características, usos y valor medicinal. Aspectos de importancia en el desarrollo de su cultivo, *Cultivos Tropicales*, **33**(4), 5-15 (2012).
28. P. Ekambaram, A.A.H. Sathali, K. Priyanka, Solid lipid nanoparticles: A review, *Scientific Reviews and Chemical Communications*, **2**(1), 80-102 (2012).
29. D.F. Cortés-Rojas, C.R. Souza, W.P. Oliveira, Encapsulation of eugenol rich clove extract in solid lipid carriers, *Journal of Food Engineering*, **127**, 34-42 (2014).



30. R.V. de Barros Fernandes, G.R. Marques, S.V. Borges, D.A. Botrel, Effect of solids content and oil load on the microencapsulation process of rosemary essential oil, *Industrial Crops and Products*, **58**, 173-181 (2014).
31. F. Donsì, M. Annunziata, M. Sessa, G. Ferrari, Nanoencapsulation of essential oils to enhance their antimicrobial activity in foods, *LWT-Food Science and Technology*, **44**(9), 1908-1914 (2011).
32. E. Frascareli, V. Silva, R. Tonon, M. Hubinger, Effect of process conditions on the microencapsulation of coffee oil by spray drying, *Food and Bioprocess Processing*, **90**(3), 413-424 (2012).
33. V. Silva, G. Vieira, M. Hubinger, Influence of different combinations of wall materials and homogenisation pressure on the microencapsulation of green coffee oil by spray drying, *Food Research International*, **61**, 132-143 (2014).
34. C. Bernal, A. Leal, J. Garzón, Obtención a escala laboratorio del octenilsuccinato aluminico de almidón de quinua con miras a su utilización en un producto cosmético, *Virtual Pro*, **95**, 16-32 (2009).
35. G. Matiz, M. Osorio, G. León, Actividad antibacteriana *in vitro* de diecinueve aceites esenciales frente a bacterias asociadas al acné, *Revista Cubana de Farmacia*, **49**(1), en prensa (2015).

## Mecanismo de desempenho eletroanalítico da 2,7-bis(ferrocenil-etinil)-fluoreno-9-ona para eletrodeteccção da hidrazina e sua descrição matemática

Volodymyr V. Tkach<sup>1\*</sup>, Somayeh Tajik<sup>2</sup>, Reza Ojani<sup>3</sup>, Michel O. G. Espínola<sup>4</sup>, Montserrat Blanes<sup>4</sup>, Petró I. Yagodynets<sup>1</sup>, Márcia H. de Rizzo da Matta<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Universidade Nacional de Chernivtsi, Ucrânia

\*E-mail: nightwatcher2401@gmail.com

<sup>2</sup>Universidade de KermanShahidBahonar, República Islâmica do Irã

<sup>3</sup>Universidade de Mazandarã, República Islâmica do Irã

<sup>4</sup>Universidade Nacional de Assunção, República do Paraguai

<sup>5</sup>Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Brasil

Recibido para evaluación: 19 de noviembre de 2014

Aceptado para publicación: 2 de julio de 2015

### RESUMO

Para o processo da eletrooxidação da hidrazina sobre a camada do composto carbonílico derivado de ferroceno, foi sugerido o mecanismo do desempenho eletroanalítico. Para ele, também foi desenvolvido e analisado (por meio da teoria de estabilidade lineal e análise de bifurcações) o modelo matemático, capaz de descrever os processos no sistema. Os resultados da modelagem foram comparados com os experimentais, bem como com os teóricos, observados para sistemas análogos

*Palavras-chave:* hidrazina, 2,7-bis(ferrocenil-etinil)-fluoreno-9-ona, sensores eletroquímicos, oscilações eletroquímicas, teoria de estabilidade linear

## SUMMARY

### Mechanism of the electroanalytical performance of 2,7-bis (ferrocenyl-ethynyl) fluorene-9-one to electro-detection of hydrazine and its mathematical description

For the process of hydrazine electrooxidation over the layer of ferrocene-carbonylic derivative, the electroanalytic functionmechanism has been suggested. Also there has been developed and analyzed (by means of linear stability theory and bifurcation analysis) the mathematical model, capable to describe the processes in the system. The results of the modeling have been compared with experimental and theoretical for analogous systems.

*Keywords:* hydrazine, 2,7-bis-(ferrocenil-ethynyl)-fluoren-9-one, electrochemical sensors, electrochemical oscillations, linear stability theory.

## INTRODUÇÃO

A hidrazina é uma substância nociva para a saúde [1-5], que atua como cancerígena, hepatotóxica, mutagênica e criadora de anomalias de sangue. Além disso, a hidrazina é reconhecida um composto nocivo para o ambiente, sendo a sua concentração máxima permitida em esgotos de 1,0 ppm [5]. Por outro lado, a hidrazina é uma substância amplamente usada como matéria-prima em Síntese Orgânica, na obtenção de fertilizantes, explosivos e como combustível em células a combustível [6]. Assim, haja vista a sua importância, o desenvolvimento de um método claro, exato, sensível e preciso para a sua detecção permanece atual [7-8].

Já foram sugeridos vários métodos da detecção de hidrazina [9-10]. O mecanismo da sua eletrooxidação foi investigado em diferentes elétrodos metálicos [11-15] e foi observado que os sobrepotenciais de eletrooxidação da hidrazina sobre os metais nobres são inferiores aos da eletrooxidação sobre os outros metais. Outrossim, o comportamento oscilatório em potencial foi observado no processo da eletrooxidação da hidrazina sobre platina [11], o que também põe em questão o porquê e a probabilidade da aparição de instabilidades eletroquímicas. Sem embargo, os metais nobres são muito caros e os elétrodos de grafite não são usados neste processo por causa de altos sobrepotenciais. Destarte, a modificação de elétrodos com vários materiais mediadores [16-26] realiza-se a fim de diminuir o sobrepotencial. Destaca-se o uso de nanopartículas [9, 16-18], dióxido de titânio [19], polímeros condutores [20-23] e do óxido de grafeno

[24-26]. No entanto, o desconhecimento do mecanismo mais provável da oxidação da hidrazina sobre certos materiais faz mais difícil a procura de um material compatível e o desenvolvimento de um modelo matemático, capaz de descrever adequadamente o comportamento do sistema, fornecer conclusões, válidas não só para o sistema concreto, mas também para semelhantes (segundo o terceiro teorema de semelhança), é um passo muito importante nesta procura.

No trabalho [27] foi construído um sensor de hidrazina, baseado no eletrodo de óxido de grafeno e pasta de carbono, modificado pelo derivado ferrocênico de natureza carbonílica. O composto atuou na eletrocatalise da eletrooxidação da hidrazina, especialmente em meio neutro, em que as influências da basicidade e alcalinidade no desempenho eletroanalítico do composto ferrocênicocarbonílico não são muito fortes. Neste trabalho será dada a continuação de estudo [27], e nele será sugerido o mecanismo ao desempenho do composto, confirmado pelos cálculos matemáticos, o que dará a possibilidade de comparar o mecanismo com os dos sistemas análogos.

Foram feitas várias tentativas de descrever matematicamente o desempenho eletroanalítico dos polímeros condutores e compósitos [28-38], ferroceno [39-40], dióxido de titânio [35] e nanopartículas do óxido de cobre (II) [41] na eletrodetecção de vários analitos, inclusive hidrazina. Agora, segue a continuação desta pesquisa importante para a compreensão do mecanismo do desempenho eletroanalítico e eletrocatalítico dos novos materiais.

## O MECANISMO E A SUA DESCRIÇÃO MATEMÁTICA

O desempenho dos elétrodos, baseados em ferroceno, não depende do pH e é apresentado como:



No entanto, observando alguns detalhes, dá para notar que do pH só não depende a reação (1) e a semirreação, oposta a (1), que faz parte da reação (2). A outra semirreação, em geral, dependendo pH. Ademais, quando o ferroceno é derivado (e na molécula modificadora tem um grupo carbonila, bem como duas ligações triplas) a primeira semirreação também vai depender do pH e, na hora da oxidação da hidrazina, o processo em meio neutro pode ser descrito como:



Neste caso, se o pH é baixo, pode acontecer a reação, oposta a (4), o que piora o desempenho eletroanalítico do composto (além do ataque protônico à hidrazina). No caso do pH alto, acontece o ataque nucleofílico do grupo carbonila, ou dos grupos adjacentes.

Por outro lado, as ligações triplas, existentes na molécula, podem reagir com as substâncias, presentes na solução. Das reações laterais também é preciso mencionar o possível ataque do grupo carbonila e das ligações triplas pela hidrazina.

Haja vista o anteriormente dito, para descrever o desempenho deste sensor, introduzimos as três variáveis:

- $c$  – a concentração da hidrazina na camada pré-superficial;
- $\theta$  – o grau de recobrimento da forma modificada do composto quinônico;
- $h$  – a concentração dos prótons na camada pré-superficial.

Para simplificar a modelagem, supomos que a solução dentro do reator esteja agitando-se intensamente, e assim é possível menosprezar o fluxo de convecção, que o eletrólito de suporte se esteja em excesso (podendo-se, destarte, menosprezar o fluxo de migração e as despesas do dopante). Também supomos que o perfil concentracional na camada pré-superficial seja linear e a espessura da camada, constante, igual a  $\delta$ .

A hidrazina entra na camada pré-superficial por meio da sua difusão, reage lá com os prótons e é oxidada pelo composto ferrocênico, cujas ligações triplas também é capaz de atacar. Destarte, a sua equação de balanço será descrita como:

$$\frac{dc}{dt} = \frac{2}{\delta} \left( \frac{\Delta}{\delta} (c_0 - c) - r_H - r_1 - r_r - r_{CO} \right) \quad (5)$$

Sendo  $\Delta$  o seu coeficiente de difusão,  $c_0$  a concentração da hidrazina no interior da solução,  $r_H$  a velocidade da protonização da hidrazina,  $r_1$  a reação da oxidação dela,  $r_r$  a reação do ataque nucleofílico da ligação tripla pela hidrazina (que e, porém, mais rápido nas condições do pH alto),  $r_{CO}$  a velocidade do ataque nucleofílico do grupo carbonila pela hidrazina.

O composto ferrocênico pode ser modificado pela hidrazina e pelos prótons, sendo depois oxidado e, também, atacado pelos prótons. Posto assim, a sua equação de balanço vai ser descrita como:

$$\frac{d\theta}{dt} = \frac{1}{G}(r_1 + r_{tr} + r_{CO} + H_{tr} - r_2 - h_{CO}) \quad (6)$$

Sendo que  $r_2$  a reação da oxidação,  $G$  a concentração máxima superficial do composto ferrocênico e  $H_{tr}$  ataque protônico da ligação tripla,  $h_{CO}$  a velocidade do ataque protônico.

Os prótons entram na camada pré-superficial por meio da sua difusão, bem como pela oxidação do composto quinônico modificado. Assim sendo, a equação de balanço dos prótons será descrita como:

$$\frac{dh}{dt} = \frac{2}{\delta} \left( \frac{D}{\delta} (h_0 - h) + r_2 - r_H - H_{tr} - h_{CO} \right) \quad (7)$$

Sendo  $D$  o coeficiente de difusão,  $h_0$  a concentração dos prótons no interior da solução.

As velocidades das respectivas reações podem ser calculadas como:

$$\begin{aligned} r_1 &= k_1 c (1 - \theta) r_H = k_H c h r_{tr} = k_r c^2 (1 - \theta) r_{CO} = k_{CO} c (1 - \theta) \\ r_2 &= k_2 \theta \exp\left(\frac{zF\varphi_0}{RT}\right) H_{tr} = k_{Htr} h^2 (1 - \theta) h_{CO} = k_{hCO} h \theta \end{aligned} \quad (8-14)$$

Geralmente o sistema de equações é muito semelhante aos descritos anteriormente, o que não contraria o terceiro teorema de semelhança. No entanto, haja vista a derivação do composto que agora tem grupos, cujo comportamento depende do pH, e ligações triplas, o sistema sofre mudanças que dão impacto ao comportamento do estado estacionário.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A fim de investigar o comportamento eletroanalítico do composto quinônico do ferroceno, analisamos o sistema de equações diferenciais linearizados por meio da teoria de estabilidade linear. A matriz funcional de Jacobi, cujos elementos são apresentados abaixo:

$$\begin{pmatrix} a_{11}a_{12}a_{13} \\ a_{21}a_{22}a_{23} \\ a_{31}a_{32}a_{33} \end{pmatrix} \quad (15)$$

Sendo:

$$\begin{aligned} a_{11} &= \frac{2}{\delta} \left( -\frac{\Delta}{\delta} - k_1(1-\theta) - k_H b - 2k_r c(1-\theta) - k_{CO}(1-\theta) \right) \\ a_{13} &= \frac{2k_H c}{\delta} \\ a_{12} &= \frac{2}{\delta} (k_1 c + k_r c^2 + k_{CO} c) \\ a_{21} &= \frac{1}{G} (k_1(1-\theta) + 2k_r c(1-\theta) + k_{CO}(1-\theta)a_{22}) \\ &= \frac{1}{G} (-k_1 c - k_r c^2 - k_{CO} c \\ &\quad - k_2 \exp\left(\frac{zF\varphi_0}{RT}\right) * k_2 \theta U \exp\left(\frac{zF\varphi_0}{RT}\right) - k_{Hr} b^2 (1-\theta) \\ &\quad - k_{bCO} b) a_{23} = \frac{1}{G} (-2k_{Hr} b(1-\theta) - k_{bCO} \theta) \\ a_{31} &= \frac{2}{\delta} (-k_H b) a_{32} \\ &= \frac{2}{\delta} \left( k_2 \exp\left(\frac{zF\varphi_0}{RT}\right) * k_2 \theta U \exp\left(\frac{zF\varphi_0}{RT}\right) - k_{Hr} b^2 (1-\theta) \right. \\ &\quad \left. - k_{bCO} b) a_{33} = \frac{2}{\delta} \left( -\frac{D}{\delta} - k_H c - 2k_{Hr} b(1-\theta) - k_{bCO} \theta \right) \end{aligned} \quad (16-24)$$

A fim de simplificar a análise do jacobiano, introduzimos as novas variáveis, de modo que ele se reescreva como:

$$\frac{4}{\delta^2 G} \begin{vmatrix} -\kappa_1 - \Lambda_1 - \Lambda_{22} & W_1 & j_1 \\ \Lambda_1 & -W_1 - W_2 & j_2 \\ -\Lambda_{22} & W_2 & -\kappa_2 - j_1 - j_2 \end{vmatrix} \quad (25)$$

A instabilidade oscilatória acontece nas condições da bifurcação de Hopf, para cuja satisfação, é preciso haver (não sendo bastante) elementos positivos na diagonal principal da matriz. Como neste sistema não tem etapas autocatalíticas, o único elemento da diagonal, capaz de ser positivo é  $W_2$ , o que acontece, como nos sistemas descritos em [28-42], por causa das influências da oxidação eletroquímica na dupla camada elétrica (DCE), que provocam alteração periódica nas suas cargas e capacitâncias. Esta causa coincide com uma das causas do comportamento oscilatório em [11].

Usando o critério de Routh-Hurwitz de estabilidade de estado estacionário, resolvemos a inequação  $\text{Det } J < 0$ . A sua resolução dá a possibilidade de inferir a condição de estabilidade do estado estacionário sob a forma de:

$$\begin{aligned} &(-\kappa_1 - \Lambda_1 - \Lambda_2)(W_1 k_2 + W_2 \kappa_2 + W_1 j_1 + W_2 j_1 + W_1 j_2) < \Lambda_2 \\ &(W_1 j_2 + W_1 j_1 + W_2 j_2) - \Lambda_1(W_2 j_1 + W_1 k_2 + W_1 j_2) \end{aligned} \quad (26)$$

Segundo a inequação (26), a estabilidade do estado estacionário (e, conseqüentemente, a manutenção da reação por si só) é controlada pela difusão (valores altos de  $\kappa_1$  e  $\kappa_2$ ) e, no caso do meio ácido, pela saída mais rápida dos prótons que do analito (neste caso, hidrazina) da camada pré-superficial ( $\Lambda_2 > \Lambda_1$ ), o que, diga-se a verdade, é muito semelhante às observações já feitas acerca dos polímeros condutores [28-30]. Resolvendo a inequação (26) relativamente ao parâmetro da difusão do analito, que é  $\kappa_1$  (e trocando os signos, a fim da melhor compreensão), obter-se-á o valor crítico dele, correspondente à margem de estabilidade do estado estacionário.

$$\kappa_1 > -\frac{\Lambda_2(W_1 j_2 + W_1 j_1 + W_2 j_2) - \Lambda_1(W_2 j_1 + W_1 k_2 + W_1 j_1 + W_1 j_2)}{(W_1 k_2 + W_2 k_2 + W_1 j_1 + W_1 j_2)} - \Lambda_1 - \Lambda_2 \quad (27)$$

A condição, expressa em (27) só não é satisfeita no caso das altas influências do processo eletroquímico sobre a DEL (ou seja, no caso do alto valor negativo do parâmetro  $W_2$ ). Esta condição vai ao encontro do descrito no artigo [27]. Neste mesmo valor crítico realiza-se a instabilidade monotônica (sendo a condição dela  $\text{Det } J = 0$ ).

$$\kappa_1 = -\frac{\Lambda_2(W_1 j_2 + W_1 j_1 + W_2 j_2) - \Lambda_1(W_2 j_1 + W_1 k_2 + W_1 j_1 + W_1 j_2)}{(W_1 k_2 + W_2 k_2 + W_1 j_1 + W_2 j_1 + W_1 j_2)} - \Lambda_1 - \Lambda_2 \quad (28)$$

Neste ponto, coexistem vários estados estacionários, todos instáveis, sendo que o sistema existe só em um. Este se destrói, após a mudança das condições do sistema.

*Meio alcalino.* No meio alcalino, troca-se a terceira variável (introduz-se a concentração da hidroxila), bem como a sua descrição. A hidroxila alcalina pouco afeta a molécula da



hidrazina, no entanto catalisa o ataque da ligação tripla, bem como da carbonila. Assim sendo, no trecho, correspondente ao meio alcalino, a curva pH – pico do parâmetro eletroquímico não deve ser igual ao correspondente ao meio ácido, ou seja, a curva, possuindo o máximo no valor neutro do pH, não deve apresentar simetria.

*Meio básico orgânico.* No meio fortemente básico de aminas primárias e secundárias (cíclicas, ou não), o comportamento é diferente do observado no caso das bases inorgânicas que contêm hidroxila, porque algumas aminas tendem a juntar-se à ligação tripla. A equação de balanço da amina deverá ser diferente da equação de balanço da hidroxila alcalina.

No entanto, na ausência da hidroxila, o ataque nucleofílico da hidrazina corre mais devagar, o que “distribui” a atividade da base mais ou menos dentro da atividade do álcali no caso anterior. Portanto a curva pH – pico do parâmetro eletroquímico não deve ser muito diferente do caso do meio básico alcalino.

*Autocatálise.* No caso dos analitos, cuja oxidação é autocatalítica, tomam-se em conta as observações, mencionadas em [28-40]. A autocatálise então se torna mais uma causa para o comportamento oscilatório.

## CONCLUSÕES

1. O desempenho do derivado carbonílico de ferroceno na eletrodetecção da hidrazina é diferente do funcionamento do próprio ferroceno, haja vista a presença do grupo carbonílico e ligações triplas, cujo comportamento depende do pH.
2. No meio ácido a atividade do composto é diferente que no meio básico (sendo também levemente diferente nos meios básicos alcalino e amínico).
3. A estabilidade de estado estacionário é controlada pela difusão e pela superioridade da velocidade da saída dos prótons da camada pré-superficial, comparada à da saída do analito.
4. A instabilidade oscilatória para este processo é possível, sendo causada pelas influências do processo da eletro-oxidação na DCE, suas cargas e capacitâncias.
5. A instabilidade monotônica é possível no caso das influências fortes da eletro-oxidação na DCE no valor marginal crítico do parâmetro da difusão do analito (neste caso, hidrazina)  $\kappa_1$ , correspondente à multiplicidade de estados estacionários, dos quais o sistema escolhe apenas um e ele se destrói após a alteração das condições físico-químicas.

## REFERÊNCIAS

1. S. Garrod, M.E. Bollard, A.W. Nicholls *et al.*, Integrated metabonomic analysis of the multiorgan effects of hydrazine toxicity in rat, *Chem. Res. Toxicol.*, **18**, 115 (2005).
2. E. H. Vernot, J.D. McEwen, R.H. Bruner *et al.*, Long-term inhalation toxicity of hydrazine, *Fund. Appl. Toxicol.*, **5**, 1050(1985).
3. J. A. Munhoz, “Apostila de riscos de toxicidade e de explosividade, Para uso em treinamento de membros da segurança do trabalho”, URL: <http://www.saude-trabalho.com.br/download/riscos-explosividade.pdf>, acessado aos 17 de novembro de 2014.
4. J. W. Mo, B. Ogorevc, X. Zhang, B. Pihlar, Cobalt and copper hexacyanoferrate modified carbon fiber microelectrode as an All-solid potentiometric microsensor for hydrazine, *Electroanal.*, **12**, 48 (2000).
5. S. Amlathe, V.K. Gupta, Spectrophotometric determination of trace amounts of hydrazine in polluted water, *Analyst*, **113**, 1481 (1988).
6. All About Hydrazine, The Artemis Project, Private enterprise on the moon, URL: <http://www.asi.org/adb/04/03/09/hydrazine-info.html>, acessado aos 17 de novembro de 2014.
7. R. Ojani, S. Safshekan, J. Raoof, Photoelectrochemical oxidation of hydrazine on TiO<sub>2</sub>-modified titanium electrode: its application for detection of hydrazine, *J. Solid State Electrochem.*, **196**, 610 (2014).
8. S. Babanova, U. Martínez, K. Artyushkova *et al.*, Hydrazine sensor for quantitative determination of high hydrazine concentrations for direct hydrazine fuel cell vehicle applications, *J. Electrochem.Soc.*, **161**, 79 (2014).
9. R. Ahmad, N. Tripathy, D.U. Jung, Y.B. Hahn, Highly sensitive hydrazine chemical sensor based on ZnO nanorods field-effect transistor, *Chem. Commun.*, **50**, 1890 (2014).
10. R. Devasenatripathy, V. Mani, S.M. Chen, Highly selective amperometric sensor for the trace level detection of hydrazine at bismuth nanoparticles decorated graphene nanosheets modified electrode, *Talanta*, **124**, 43 (2014).

11. G. Horanyi, G. Inzelt, E. Izetey, Open circuit potential oscillations of platinum electrodes immersed in solutions of organic fuels and redox systems. Imitation of galvanostatic potential oscillations observed in the course of electrooxidation of organic fuels, *J. Electroanal. Chem.*, **81**, 395 (1977).
12. K. Korinek, J. Korita, M. Nusiloua, Electro-oxidation of hydrazine on mercury, silver and gold electrodes in alkaline solutions, *J. Electroanal. Chem.*, **21**, 319 (1969).
13. M. Fleischmann, K. Korinek, D. Piewner, Electro-oxidation of hydrazine on mercury, silver and gold electrodes in alkaline solutions, *J. Electroanal. Chem.*, **34**, 499 (1972).
14. S. Karr, L. Meites, The voltammetric characteristics and mechanism of electro-oxidation of hydrazine, *J. Am. Chem. Soc.*, **84**, 906 (1962).
15. J.A. Harrison, Z.A. Khan, The oxidation of hydrazine in alkaline solution at platinum and mercury, *J. Electroanal. Chem.*, **26**, 1 (1970).
16. S.K. Mehta, K. Singh, A. Umar *et al.*, Ultra-high sensitive hydrazine chemical sensor based on low-temperature grown ZnO nanoparticles, *Electrochem. Acta*, **69**, 128 (2012).
17. J. Liu, Y. Li, J. Jiang, X. Huang, C@ZnO nanorod array-based hydrazine electrochemical sensor with improved sensitivity and stability, *Dalton Trans.*, **37**, 8693 (2010).
18. J.B. Raoof, R. Ojani, F. Jamali, S.R. Hosseini, Electrochemical detection of hydrazine using a copper oxide nanoparticle modified glassy carbon electrode, *Casp. J. Chem.*, **1**, 73 (2012).
19. R. Ojani, E. Zarei, A new and simple electrochemically assisted photocatalysis sensor of hydrazine using a Ti/TiO<sub>2</sub> electrode, *J. Braz. Chem. Soc.*, **24**, 657 (2013).
20. H. Shu, "Applications of poly(3-hexylthiophene) thin film as a hydrazine-sensitive chemoresistor", M. Sc. Thesis, Auburn, Alabama, 2006.
21. S. Ameen, M. Shaheer Akhtar, H.S. Shin, Hydrazine chemical sensing by modified electrode based on in situ electrochemically synthesized polyaniline/graphene composite thin film, *Sens. Act. B.*, **173**, 177 (2012).

22. D. Oukil, L. Benhaddad, L. Makhloufi *et al.*, Gold nanoparticles modified polypyrrole/iron electrode used as sensor for hydrazine detection, *Sens. Lett.*, **11**, 295 (2013).
23. S. Virji, R.B. Kaner, B.H. Weiller, Hydrazine detection by polyaniline using fluorinated alcohol additives, *Chem. Mater.*, **17**, 1256-1260 (2005).
24. M.A. Gross, M. J. A. Sales, M.A.G. Soler *et al.*, Reduced graphene oxide multilayers for gas and liquid phases chemical sensing, *RSC Adv.*, **34**, 17917 (2014).
25. S. Takahashi, N. Abiko, J. Anzai, Redox response of reduced graphene oxide-modified glassy carbon electrodes to hydrogen peroxide and hydrazine, *Materials*, **6**, 1840 (2013).
26. Z. Bo, X. Shuai, S. Mao *et al.*, Green preparation of reduced graphene oxide for sensing and energy storage applications, *Sci. Rep.*, N. 4684 (2014).
27. S.E. Baghbamidi, H. Beitollahi, S. Tajik, Graphene oxide nano-sheets/ferrocene derivative modified carbon paste electrode as an electrochemical sensor for determination of hydrazine, *Anal. Bioanal. Electrochem.*, **6**, 634 (2014).
28. V. Tkach, V. Nechyporuk, P. Yagodynets', I. Rusnak, Los biosensores, basados en los polímeros conductores, y la descripción matemática de su desempeño, *Orbital Elec. J. Chem.*, **4**, 136 (2012).
29. V. Tkach, V. Nechyporuk, P. Yagodynets', The mathematical stability study of the work of isomerization sensors, based on conduction polymers, *Anal. Bioanal. Electrochem.*, **6**, 273 (2014).
30. V. Tkach, V. Nechyporuk, P. Yagodynets, El estudio de estabilidad en el proceso del desempeño de los sensores y biosensores, basados en los polímeros conductores en medio fuertemente ácido, *Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm.*, **42**, 30 (2013).
31. V. Tkach, V. Nechyporuk, P. Yagodynets', A descrição matemática do processo da detecção de duas substâncias com um grupo funcional comum pelos sensores e biosensores eletroquímicos, baseados em polímeros conductores, *Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm.*, **42**, 215 (2013).
32. V. Tkach, V. Nechyporuk, P. Yagodynets', A investigação matemática do desempenho de biosensores eletroquímicos enzimáticos, baseados nos polímeros condutores, *Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm.*, **41**, 203 (2012).

33. Tkach, V. Nechyporuk, P. Yagodynets', Yu. Meslyuk, Mathematical model of the work of the mediated conducting polymer sensors with the use of the polymers of heterocyclic compounds, *Rev. Soc. Quím. Perú.*, **77**, 259 (2011).
34. V. Tkach, G. Maia, S.C. de Oliveira, R. Ansari, R. Ojani, P. Yagodynets', Anais do 7º Encontro Nacional de Tecnologia Química, Vitória, ES, Brasil, 17 a 19 de Setembro de 2014.
35. V. Tkach, V. Nechyporuk, P. Yagodynets', III Encontro em Técnicas de Caracterização em Análise Química, 6 de junho de 2014, Braga, Portugal, p. 73.
36. V. Tkach, B. Kumara Swamy, R. Ojani, M. Blanes, P. Yagodynets', El mecanismo de la oxidación de omeprazol sobre el electrodo de carbono vitroso, modificado por polializarina, y su descripción matemática, *Orbital. Elec. J. Chem.*, **7**, 1 (2015).
37. V. Tkach, V. Nechyporuk, P. Yagodynets', Proceedings of the 1st CQM Annual Meeting and the 9<sup>th</sup> Materials' Group Meeting of the University of Madeira, 31<sup>st</sup> of January – 1st of February 2014, Funchal, Região Autónoma da Madeira, Portugal, 2014, p. 37.
38. V. Tkach, V. Nechyporuk, R. Ojani, P. Yagodynets', M. Tazyrov. Anales del XXX Congreso Argentino de Química, 22 al 24 de Octubre de 2014, Buenos Aires, URL: <http://aqa.org.ar/pdf101/cd/Qca.Analitica/1-001.pdf>, acessado a os 17 de novembro de 2014.
39. V. Tkach, R. Ojani, V. Nechyporuk, P. Yagodynets', M. Tazyrov, Libro del XXVII Congreso Nacional de Química Analítica, 25 al 27 de junio de 2014, Puebla, México, p. 56.
40. V. Tkach, R. Ojani, V. Nechyporuk, P. Yagodynets, Modelagem matemática do desempenho de elétrodos, modificados por camada de ferroceno nos processos da eletrooxidação de compostos orgânicos em meios neutro e ácido, *Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm.*, **43**, 35 (2014).
41. V. Tkach, R. Ojani, V. Nechyporuk, P. Yagodynets', A descrição matemática do desempenho eletroanalítico de nanopartículas de óxido de cobre (II) na eletrodeteção de hidrazina, *Orbital. Elec. J. Chem.*, **6**, 142 (2014).

## Solvatación preferencial de la naringina en mezclas cosolventes etanol + agua mediante el método de las integrales inversas de Kirkwood-Buff

Diego Iván Caviedes Rubio<sup>1</sup>, Reinaldo Gabriel Sotomayor Pino<sup>2</sup>, Daniel Ricardo Delgado<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Grupo de Investigación en Administración de Operaciones y Producción, Programa de Ingeniería Industrial, Facultad de Ingeniería, Universidad Cooperativa de Colombia, calle 11 No. 1G-31B, Neiva, Huila, Colombia.

\*Correo electrónico: danielr.delgado@campusucc.edu.co.

<sup>2</sup> Grupo de Investigación en Control y Tecnología Farmacéutica (Gitecfar), Programa de Farmacia, Facultad de Química y Farmacia, Universidad del Atlántico, Km 7 Antigua Vía Puerto Colombia, Barranquilla, Atlántico, Colombia.

Recibido para evaluación: 19 de febrero de 2015.

Aceptado para publicación: 25 de julio de 2015.

### RESUMEN

Los parámetros de solvatación preferencial, es decir, las diferencias entre la fracción molar local y de la solución de los solventes en solución de naringina se derivan de su solubilidad en mezclas cosolventes mediante el método de las integrales inversas de Kirkwood-Buff. Según el método IKBI, la naringina es sensible a los efectos específicos de solvatación según la composición cosolvente, por lo que el parámetro de solvatación preferencial por  $\delta x_{1,3}$ , es negativo en mezclas ricas en agua y en mezclas ricas en etanol, pero positivo en composiciones entre 0,24 y 0,40 en fracción molar de etanol. Esto podría demostrar el papel relevante de hidratación hidrofóbica alrededor de los grupos no polares en la solvatación de fármacos en mezclas ricas en agua. Por otro lado, en mezclas de composiciones cosolventes intermedias, el fármaco es solvatado principalmente por etanol, posiblemente debido al comportamiento básico de la mezcla cosolvente; mientras que en mezclas ricas en etanol, la solvatación preferencial por el agua podría deberse al carácter ácido del agua.

*Palabras clave:* naringina, solubilidad, integrales inversas de Kirkwood-Buff, IKBI, solvatación preferencial.

## SUMMARY

### Preferential solvation of naringin in ethanol + water cosolvent mixtures according with the inverse Kirkwood-Buff integrals

The preferential solvation parameters, *i.e.*, the differences between the local and bulk mole fractions of the solvents in solutions of naringin is derived from their solubility in binary solvent mixtures by means of the inverse Kirkwood-Buff integral (IKBI) method. According to IKBI method it is found that naringin is sensitive to solvation effects, so the preferential solvation parameter by ethanol  $\delta x_{1,3}$ , is negative in water-rich and ethanol-rich mixtures but positive in compositions from 0.24 to 0.40 in mole fraction of ethanol. This could demonstrate the relevant role of hydrophobic hydration around the non-polar groups in the drug solvation in water-rich mixtures. Otherwise, in mixtures of intermediate co-solvent compositions, the drug is mainly solvated by ethanol, probably due to the basic behavior of the co-solvents; whereas, in ethanol-rich mixtures, the preferential solvation by water could be due to the acidic behavior of water.

*Key words:* Naringin, solubility, inverse Kirkwood-Buff integrals, IKBI, preferential solvation.

## INTRODUCCIÓN

La naringina (véase figura 1) (4'-5-7'-trihidroxiflavanona-7-ramnoglicósido,  $C_{27}H_{32}O_{14}$ , CAS 10236-47-2) es una flavanona predominante en frutos cítricos y es la principal responsable de su sabor amargo [1, 2]. Al administrarse por vía oral la naringina, es hidrolizada a naringenina, que es el principal metabolito que se absorbe [3]. La naringina y naringenina son posibles inhibidores de las enzimas CYP [4]; además, se han reportado varios efectos terapéuticos como antioxidante, antimicrobiana, hipolipemiante, antiinflamatorio, anticancerígeno [5] y posee propiedades hipocolesterolémicas, debido a que reduce el nivel del colesterol de baja densidad en el plasma [6].

En cuanto a la solubilidad de fármacos en mezclas cosolventes, esta ha sido ampliamente estudiada, en donde la mayoría de los estudios describen el comportamiento de las isothermas de solubilidad en función de la composición cosolvente; otro número importante de investigaciones dirige sus esfuerzos hacia el desarrollo de modelos matemáticos a partir de datos experimentales, con el ánimo de desarrollar modelos semiempíricos que permitan calcular la solubilidad de un fármaco con un margen de error bajo.

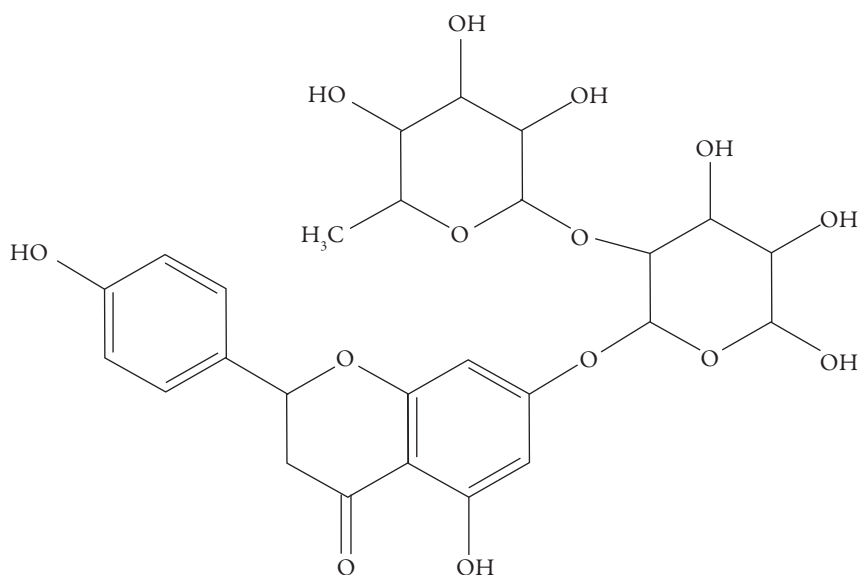


Figura 1. Estructura molecular de la naringina.

En este contexto, Acree y Rytting desarrollan el modelo denominado “solvente binario casi ideal, NIBS”, el cual ha tenido éxito en la modelización de la solubilidad de algunos fármacos [7]; mientras que en otros casos, en donde los rangos de la polaridad de las mezclas cosolventes es mayor, el modelo de Jouyban, Khoubnasabafari y Acree [8] ha sido más apropiado. Otros modelos, como los basados en áreas de superficie [9], la contribución de grupos UNIFAC [10], los parámetros de solubilidad de Hildebrand [11], las integrales Kirkwood-Buff [12], etc., también han sido empleados. Es innegable la gran importancia de estos estudios para la industria farmacéutica o alimentaria, permitiendo optimizar procesos de investigación y desarrollo, ofreciendo herramientas que permiten reducir el número de ensayos experimentales y exponiendo una alternativa viable para el aprovechamiento eficiente de algunos residuos agroindustriales, mediante la extracción, cristalización y purificación de sustancias de interés comercial presentes en estos materiales generalmente desechados. Sin embargo, tales investigaciones no describen el entorno próximo de la molécula de soluto en la solución, lo que permitiría racionalizar los eventos moleculares en procesos de importancia industrial como los mencionados anteriormente, salvo en algunos intentos como los realizados por Acree [13], quien empleó el método integrales inversas de Kirkwood-Buff (IKBI) propuestas por el profesor Ben-Naim [14]. Sin embargo, no hay información sobre la composición del disolvente en el entorno inmediato de las moléculas de soluto y las interacciones que conducen a estas preferencias. Otro caso en el que se empleó un



enfoque bastante similar fue el estudio de Shulgin y Ruckenstein [15], quienes utilizaron las integrales de Kirkwood-Buff para estimar el exceso de hidratación de solutos gaseosos en soluciones acuosas diluidas de cloruro de sodio, donde la sal se trata como un codisolvente.

El propósito de este trabajo es aplicar el enfoque del modelo IKBI [14] a la solvatación preferencial de la naringina en mezclas cosolventes etanol + agua. Los resultados se expresan en términos del parámetro de solvatación preferencial  $\delta x_{1,3}$  para el soluto 3 por los solventes de la mezcla 1 y 2:

$$\delta x_{1,3} = x_{1,3}^L - x_1 = -\delta x_{2,3} \quad (1)$$

Donde  $x_1$  es la fracción molar del solvente 1 (solvente orgánico) en la mezcla cosolvente y  $x_{1,3}^L$  es la fracción molar local de 1 en la vecindad de la molécula del soluto 3. Si  $\delta x_{1,3} > 0$ , entonces 3 se solvata preferentemente por 1. Cuando  $|\delta x_{1,3}| \leq 0,01$ , los valores probablemente se encuentran dentro del error de la determinación, lo que significa que la solvatación preferencial es insignificante; de lo contrario, el grado de solvatación preferente se determina por la magnitud de  $\delta x_{1,3}$ . De hecho, los valores  $\delta x_{1,3} \approx x_2$  significan  $\delta x_{1,3} \approx 1$  o solvatación selectiva completa de 3 por 1; por tanto,  $\delta x_{1,3}$  no puede ser mayor que  $x_2$  [16].

La solvatación preferencial del soluto 3 en la mezcla cosolvente 1 + 2, no solo depende de las interacciones de 3 con 1 y con 2, sino también de las interacciones mutuas de los dos solventes, como se describe por la energía Gibbs de exceso  $G_{1+2}^E$ , de la mezcla cosolvente libre se soluto. La competencia de interacciones de los tres componentes, se lleva a cabo en la solución.

A partir de los datos de solubilidad de 3 en los solventes puros y en las diferentes mezclas cosolventes, se calcula la energía Gibbs estándar de transferencia de 3 de 1 a 1 + 2.

$$\Delta_r G_{3,2 \rightarrow 1+2}^0 = RT \ln \frac{x_{3,2}}{x_{3,1+2}} \quad (2)$$

La ecuación (2) debe ser utilizada siempre que el soluto 3 sea escasamente soluble en todas las composiciones cosolventes, de tal forma que las interacciones soluto-soluto puedan ser descartadas asumiendo entonces que las moléculas de soluto están rodeadas únicamente por moléculas de solvente. De lo contrario, se deben tener en cuenta los coeficientes de actividad de 3 en cada composición cosolvente. Otra disposición para la aplicación de la ecuación (2), es que la identidad del sólido que está en equilibrio con las soluciones saturadas es independiente de la composición del disolvente; es decir, el soluto no forma solvatos o hidratos con los solventes puros alterando la composición cosolvente.

La aplicación del método IKBI está, por tanto, limitada a sistemas en los que la información de la energía Gibbs de exceso de las mezclas cosolventes entre disponible y las solubilidades sean lo suficientemente bajas.

En este contexto, las expresiones matemáticas para la aplicación del enfoque IKBI dada por Ben-Naim [14] han sido manipuladas algebraicamente, conduciendo a las siguientes expresiones [17, 18]:

$$\delta x_{3,1} = x_1 x_2 (G_{1,3} - G_{2,3}) / [x_1 G_{1,3} + x_2 G_{2,3} + V_{cor}] \quad (3)$$

$$G_{1,3} = RT\kappa_T - V_3 + x_2 V_2 D / Q \quad (4)$$

$$G_{2,3} = RT\kappa_T - V_3 + x_1 V_1 D / Q \quad (5)$$

$$V_{cor} = 2522,5 \left[ r_3 + 0,1363 \left\{ x_1^L V_1 + (1 - x_1^L) V_2 \right\}^{1/3} - 0,085 \right]^3 \quad (6)$$

$$D = \left[ d\Delta_i G_{3,2 \rightarrow 1+2}^0 / dx_1 \right]_{P,T} \quad (7)$$

$$Q = RT + \left[ x_1 x_2 d^2 G_{1,2}^E / dx_2^2 \right]_{P,T} \quad (8)$$

En donde  $G_{1,3}$  y  $G_{2,3}$  son las integrales Kirkwood-Buff (en  $\text{cm}^3 \text{mol}^{-1}$ ), las cuales se calculan a partir de las ecuaciones (4) y (5) y  $V_{cor}$  es el volumen de correlación alrededor de 3 en el que la solvatación preferencial tiene lugar. En las ecuaciones (4) y (5),  $\kappa_T$  es la compresibilidad isotérmica de las mezclas (en  $\text{GPa}^{-1}$ ),  $V_3$  es el volumen molar parcial del soluto y  $V_1$  y  $V_2$  son los de los disolventes (en  $\text{cm}^3 \text{mol}^{-1}$ ), mientras que  $D$  y  $Q$  (en  $\text{kJ mol}^{-1}$ , al igual que  $RT$ ) se calculan a partir de las ecuaciones (7) y (8).

Como  $\kappa_T$  depende de la composición cosolvente, puede ser calculada asumiendo comportamiento aditivo, donde la compresibilidad isotérmica de la mezcla cosolvente se calcula a partir de la compresibilidad isotérmica de los componentes puros, multiplicada por sus respectivas fracciones molares en la mezcla cosolvente:

$$\kappa_T = \sum_{i=1}^n x_i \kappa_{T,i} \quad (9)$$

Los volúmenes molares parciales se calcularon por medio de las ecuaciones (10) y (11) [19], a partir de los valores de densidad de las mezclas de etanol + agua reportados por Jiménez, Manrique y Martínez [20], a todas las temperaturas de estudio,  $V$  es el volumen molar de las mezclas y se calcula como  $V = (x_1M_1 + x_2M_2)/\rho$ . Donde  $M_1$  y  $M_2$  son 46,06 y 18,02 g mol<sup>-1</sup>, respectivamente.

$$\bar{V}_1 = V + x_2 \frac{dV}{dx_1} \quad (10)$$

$$\bar{V}_2 = V - x_1 \frac{dV}{dx_1} \quad (11)$$

La ecuación (3) para el volumen de correlación requiere iteración porque depende de las fracciones molares locales dadas por las ecuaciones (1) y (3). Finalmente, el radio molecular de 3 se calculó a partir del volumen molecular, el cual, a su vez, se calculó a partir del volumen molar calculado mediante el método de contribución de grupos de Fedors [21] (véase tabla 1).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los datos de solubilidad de la naringina se tomaron de Zhang *et al.* [22] (véase tabla 2), las energías Gibbs estándar de transferencia de la naringina desde el agua pura hasta las mezclas cosolventes etanol + agua se calcularon mediante la ecuación (2) y se correlacionaron mediante un polinomio regular de cuarto orden de acuerdo con la ecuación (12) (véase tabla 3).

Tabla 1. Aplicación del método de Fedors para el cálculo del volumen molar, la energía interna y el parámetro de solubilidad de Hildebrand de la naringina.

Grupo	Número	V (cm <sup>3</sup> /mol)	U (kJ/mol)
-CH <sub>3</sub>	1	1 x 33,50	1 x 4,71
-CH <sub>2</sub> -	1	1 x 16,10	1 x 4,94
>CH-	11	11 x -1,00	11 x 3,43
>C=O	1	1 x 10,8	1 x 17,4
-O-	5	5 x 3,8	5 x 3,35
-OH	8	8 x 10,0	8 x 29,8
Fenileno ( <i>p</i> )	1	1 x 52,4	1 x 31,9

(Continúa)

Tabla 1. Aplicación del método de Fedors para el cálculo del volumen molar, la energía interna y el parámetro de solubilidad de Hildebrand de la naringina (*continuación*).

Grupo	Número	V (cm <sup>3</sup> /mol)	U (kJ/mol)
Fenilo tetrasustituido	1	1 x 14,4	1 x 31,9
Cierre de anillo	3	3 x 16,00	3 x 1,05
	Total	263,2	386,88
	Parámetro de solubilidad	$(386.880/263,2)^{1/2}$	38,34 MPa <sup>1/2</sup>

La figura 2 muestra la energía Gibbs de transferencia a diferentes temperaturas y los coeficientes de los polinomios se reportan en la tabla 4.

$$\Delta_r G_{3,1 \rightarrow 1+2}^0 = RT \ln \left( \frac{x_{3,1}}{x_{3,1+2}} \right) = a + bx_1 + cx_1^2 + dx_1^3 + ex_1^4 \quad (12)$$

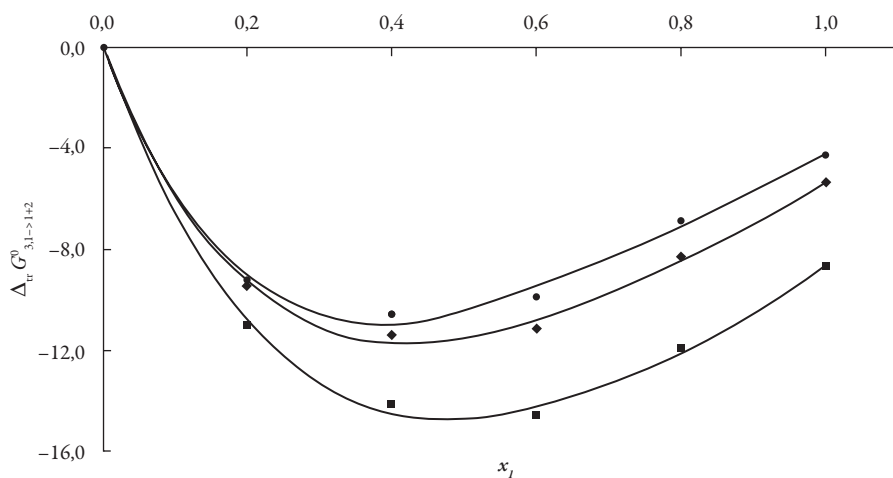


Figura 2. Energía Gibbs estándar de la transferencia de la naringina desde el agua pura hasta cada una de las mezclas cosolventes EtOH + W a  $\blacksquare$  = 293,15 K;  $\blacklozenge$  = 303,15 K y  $\bullet$  = 313,15 K.

Tabla 2. Solubilidad en fracción molar ( $x_3$ )<sup>a</sup> de la naringina a diferentes temperaturas.

$x_1$	293,15 K	298,15 K	303,15 K	308,15 K	313,15 K
0,00	$9,76 \times 10^{-7}$	$2,87 \times 10^{-6}$	$6,15 \times 10^{-6}$	$1,10 \times 10^{-5}$	$1,55 \times 10^{-5}$
0,20	$8,96 \times 10^{-5}$	$1,32 \times 10^{-4}$	$2,59 \times 10^{-4}$	$3,52 \times 10^{-4}$	$5,46 \times 10^{-4}$
0,40	$3,23 \times 10^{-4}$	$3,88 \times 10^{-4}$	$5,67 \times 10^{-4}$	$6,59 \times 10^{-4}$	$8,93 \times 10^{-4}$
0,60	$3,90 \times 10^{-4}$	$4,42 \times 10^{-4}$	$5,02 \times 10^{-4}$	$5,79 \times 10^{-4}$	$6,86 \times 10^{-4}$
0,80	$1,31 \times 10^{-4}$	$1,43 \times 10^{-4}$	$1,64 \times 10^{-4}$	$1,82 \times 10^{-4}$	$2,19 \times 10^{-4}$
1,00	$3,45 \times 10^{-5}$	$4,05 \times 10^{-5}$	$5,17 \times 10^{-5}$	$6,25 \times 10^{-5}$	$7,96 \times 10^{-5}$

<sup>a</sup> Reportado por Zhang *et al.* [22].

Tabla 3. Energía Gibbs de transferencia ( $\text{kJ mol}^{-1}$ ) de la naringina desde el agua pura hasta las mezclas cosolventes etanol + agua a varias temperaturas.

$x_1$	293,15 K	298,15 K	303,15 K	308,15 K	313,15 K
0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
0,20	-11,02	-9,50	-9,43	-8,89	-9,27
0,40	-14,14	-12,16	-11,40	-10,49	-10,55
0,60	-14,60	-12,49	-11,10	-10,16	-9,86
0,80	-11,95	-9,69	-8,28	-7,20	-6,89
1,00	-8,69	-6,56	-5,36	-4,45	-4,26

Tabla 4. Coeficientes de la ecuación (12) empleada en el cálculo de la energía Gibbs de transferencia ( $\text{kJ mol}^{-1}$ ) de la naringina desde el agua pura hasta las mezclas cosolventes etanol + agua a varias temperaturas.

Coefficientes	293,15 K	298,15 K	303,15 K	308,15 K	313,15 K
$a$	-0,03	-0,04	-0,03	-0,04	-0,04
$b$	-79,15	-66,97	-70,57	-66,43	-72,01
$c$	146,29	117,63	142,96	135,63	159,16
$d$	-110,9	-79,367	-113,75	-106,15	-135,6
$e$	35,133	22,221	35,996	32,58	44,257

Los valores de  $D$  se calcularon a partir de la primera derivada de los modelos polinomiales (ecuación 13) en función de la fracción molar de cosolvente (véase tabla 5).

$$D = b + 2cx_1 + 3dx_1^2 + 4ex_1^3 \quad (13)$$

Tabla 5. Valores de  $D$  ( $\text{kJ mol}^{-1}$ ) de la naringina en mezclas cosolventes etanol + agua a varias temperaturas.

$x_1$	293,15 K	298,15 K	303,15 K	308,15 K	313,15 K
0,00	-79,15	-66,97	-70,57	-66,43	-72,01
0,10	-53,08	-45,74	-45,25	-42,36	-44,07
0,20	-32,82	-28,73	-25,89	-23,88	-23,20
0,30	-17,53	-15,42	-11,62	-10,20	-8,35
0,40	-6,36	-5,28	-1,59	-0,54	1,56
0,50	1,53	2,24	5,07	5,87	7,58
0,60	6,98	7,67	9,23	9,83	10,77
0,70	10,83	11,53	11,75	12,11	12,20
0,80	13,94	14,36	13,48	13,49	12,93
0,90	17,13	16,70	15,31	14,76	14,02
1,00	21,26	19,07	18,08	16,70	16,54

Para calcular los valores de  $Q$ , son necesarios los valores de las energías Gibbs molar de exceso  $G_{1,2}^E$  de las mezclas cosolventes etanol + agua a las diferentes temperaturas de estudio calculadas mediante la ecuación (14) propuesta por Marcus [18] para 298,15 K y la ecuación (15) para las otras temperaturas de estudio, en donde  $H_{1,2}^E$  es la entalpía molar de exceso de la mezcla cosolvente,  $T_1$  es 298,15 K y  $T_2$  es la temperatura diferente de 298,15 K a la que se desea calcular  $G_{1,2}^E$ . Las entalpías molares de exceso se calculan a partir de la ecuación (16) también propuesta por Marcus [18].

$$G_{1,2}^E = x_1 x_2 \left( 2907 - 777(1 - 2x_1) + 494(1 - 2x_1)^2 \right) \quad (14)$$

$$G_{1,2}^E(T_2) = G_{1,2}^E(T_1) - T \int_{T_1}^{T_2} H_{1,2}^E d\left(\frac{1}{T}\right) \approx \frac{T_2}{T_1} G_{1,2}^E(T_1) + H_{1,2}^E \left( 1 - \frac{T_2}{T_1} \right) \quad (15)$$

$$H_{1,2}^E = x_1 x_2 \left( -1300 - 3567(1 - 2x_1) - 4971(1 - 2x_1)^2 \right) \quad (16)$$

Sin embargo, los valores de  $Q$ ,  $RTK_T$  y el volumen molar parcial del etanol y el agua en cada mezcla cosolvente y de los solventes puros se tomaron de Delgado, Vargas y Martínez [23], y de Delgado, Peña y Martínez [24]. El radio molecular de la naringina calculado a partir del volumen molar usando la ecuación (17) es de 0,471 nm.

$$r_3 = \sqrt[3]{(3 \times 10^{21} \cdot V_3) / (4 \cdot \pi \cdot N_{AV})} \quad (17)$$

En donde  $N_{Av}$  es el número de Avogadro [25].

En las tablas 6 y 7 se muestran los valores de  $G_{1,3}$  y  $G_{2,3}$  y en la tabla 8 los valores del volumen de correlación de la naringina a diferentes temperaturas.

Tabla 6. Valores de  $G_{1,3}$  ( $\text{cm}^3 \text{mol}^{-1}$ ) para la naringina en mezclas cosolventes etanol + agua a diferentes temperaturas.

$x_1$	293,15 K	298,15 K	303,15 K	308,15 K	313,15 K
0,00	-848,3	-750,4	-768,5	-731,6	-763,8
0,10	-675,2	-625,1	-628,5	-612,3	-634,3
0,20	-513,0	-487,0	-469,9	-458,9	-458,3
0,30	-389,7	-375,1	-347,9	-338,0	-324,6
0,40	-305,9	-297,6	-272,1	-264,9	-251,0
0,50	-250,8	-246,6	-229,2	-225,4	-216,5
0,60	-215,3	-213,4	-206,1	-205,1	-202,3
0,70	-199,9	-198,5	-199,5	-199,9	-201,5
0,80	-213,4	-212,3	-215,6	-216,2	-218,3
0,90	-241,6	-241,9	-243,4	-244,2	-244,8
1,00	-260,4	-260,3	-260,3	-260,2	-260,2

Tabla 7. Valores de  $G_{2,3}$  ( $\text{cm}^3 \text{mol}^{-1}$ ) para la naringina en mezclas cosolventes etanol + agua a diferentes temperaturas.

$x_1$	293,15 K	298,15 K	303,15 K	308,15 K	313,15 K
0,00	-262,1	-262,1	-262,0	-262,0	-262,0
0,10	-400,1	-383,9	-386,0	-381,2	-389,3
0,20	-457,5	-438,1	-425,6	-417,5	-417,9
0,30	-439,0	-419,7	-382,1	-368,5	-350,2
0,40	-360,8	-342,8	-285,6	-269,5	-238,1
0,50	-225,2	-210,2	-149,7	-136,4	-104,9
0,60	-14,9	-3,3	35,3	41,0	57,1
0,70	265,6	278,8	269,2	266,9	254,4
0,80	456,5	472,9	422,7	418,0	386,0
0,90	398,1	383,9	332,4	313,5	287,4
1,00	248,4	190,9	162,7	126,1	118,8

Tabla 8. Volumen de correlación ( $\text{cm}^3 \text{mol}^{-1}$ ) para la naringina de mezclas cosolventes etanol + agua a diferentes temperaturas.

$x_1$	293,15 K	298,15 K	303,15 K	308,15 K	313,15 K
0,00	1036	1037	1037	1038	1038
0,10	1095	1102	1103	1106	1106
0,20	1212	1216	1220	1223	1225
0,30	1326	1328	1329	1331	1333
0,40	1418	1419	1416	1418	1419
0,50	1492	1494	1491	1493	1494
0,60	1555	1559	1559	1562	1565
0,70	1618	1622	1627	1632	1639
0,80	1702	1707	1715	1720	1729
0,90	1815	1821	1829	1835	1843
1,00	1928	1934	1940	1947	1954

De acuerdo con los valores de  $G_{1,3}$  y  $G_{2,3}$ , la naringina se hidrata preferentemente en mezclas ricas en agua ( $0,00 \leq x_1 \leq 0,20$ ) a todas las temperaturas de estudio, puesto que  $G_{1,3} < G_{2,3}$ . Sin embargo, entre  $x_1 = 0,20$  y  $0,40$ ,  $G_{1,3} > G_{2,3}$ , lo que indica que la naringina se solvata preferentemente por el etanol en este rango de composición. En mezclas intermedias y ricas en etanol ( $0,50 \leq x_1 \leq 1,00$ ), nuevamente se hidrata. Este análisis es corroborado por los datos de  $\delta x_{1,3}$  (véase tabla 9), que varían de manera no lineal en función de la composición cosolvente (véase figura 3). Al adicionar etanol  $\delta x_{1,3}$  adquiere valores negativos, indicando que la molécula de naringina tiende a hidratarse preferentemente en mezclas ricas en agua de manera similar a otras moléculas en este sistema cosolvente [26, 27]. Usualmente, en la mayoría de los fármacos esta hidratación es consecuencia de la hidratación hidrofóbica; sin embargo, aunque la naringina presenta algunos grupos poco polares, el gran número de grupos  $-\text{OH}$  produciría una mayor interacción con agua actuando como un ácido de Lewis, estableciendo puentes de hidrógeno con los grupos funcionales de los solventes ( $-\text{OH}$ ). Además, este flavonoide podría actuar como una base de Lewis debido a los pares de electrones libres en los átomos de oxígeno de los grupos hidróxido, éter y oxo para interactuar con los hidrógenos de ambos disolventes.

En las mezclas con composición  $0,20 \leq x_1 \leq 0,40$ ,  $\delta x_{1,3}$  toma valores positivos indicando que la naringina se solvata preferentemente por el etanol; esta solvatación por parte del etanol contribuye al aumento de la solubilidad de la naringina por al menos tres mecanismos: 1) promueve la desestructuración del agua alrededor de los grupos no polares



aumentando el agua libre y, por ende, las interacciones agua-naringina, 2) el aumento en la concentración de etanol en la mezcla cosolvente favorecería las interacciones no polares entre el etanol y el flavonoide y 3) al aumentar la concentración de etanol, la polaridad de la mezcla disminuye hasta igualar la de la naringina ( $38,34 \text{ MPa}^{1/2}$ ).

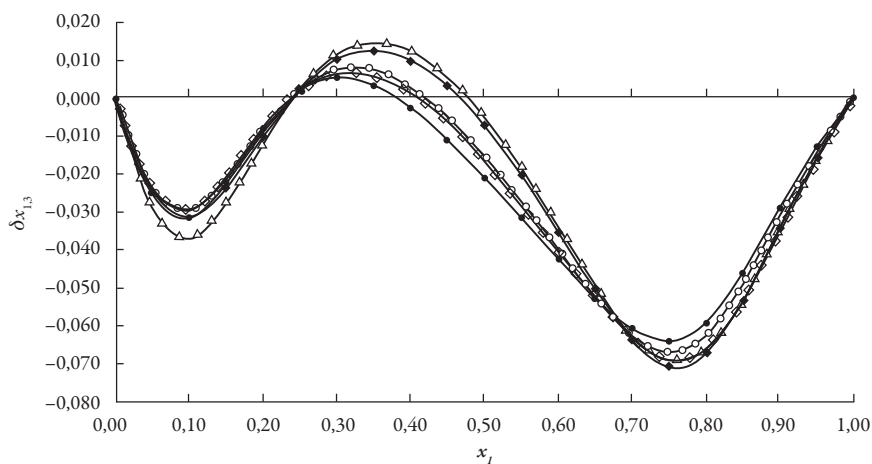


Figura 3. Valores de  $\delta x_{1,3}$  para la naringina en mezclas cosolventes etanol + agua a  $\Delta = 293,15 \text{ K}$ ;  $\blacktriangledown = 298,15 \text{ K}$ ;  $\circ = 303,15 \text{ K}$ ;  $\diamond = 308,15 \text{ K}$  y  $\bullet = 313,15 \text{ K}$ .

En mezclas intermedias y ricas en etanol,  $0,50 \leq x_1 \leq 1,00$ ,  $\delta x_{1,3}$  vuelve a tener valores negativos indicando una hidratación preferencial. Delgado y Martínez [28] proponen que esta hidratación de las moléculas en mezclas ricas en cosolvente, se debe a que la fracción molar local de cosolvente en la esfera de solvatación depende de la polaridad del soluto, el cual promueve un entorno con una polaridad similar, razón por la cual la molécula de naringina tendería a hidratarse para aumentar la polaridad de la esfera de solvatación en mezclas cuya polaridad es menor de  $38,34 \text{ MPa}^{1/2}$ . Sin embargo, siendo más rigurosos en el análisis de los resultados de  $\delta x_{1,3}$ , es importante resaltar que en mezclas  $0,20 \leq x_1 \leq 0,40$  a todas las temperaturas y  $0,20 \leq x_1 \leq 0,50$  a  $293,15 \text{ K}$  y  $298,15 \text{ K}$  los valores de  $\delta x_{1,3}$  son muy próximos a  $0,01$  o menores a este valor, por lo que no es posible definir si la naringina se solvata o no por el etanol.

En las mezclas con composición  $0,20 \leq x_1 \leq 0,40$ ,  $\delta x_{1,3}$  toma valores positivos indicando que la naringina se solvata preferentemente por el etanol; esta solvatación por parte del etanol contribuye al aumento de la solubilidad de la naringina por al menos tres mecanismos: 1) promueve la desestructuración del agua alrededor de los grupos no polares

aumentando el agua libre y, por ende, las interacciones agua-naringina, 2) el aumento en la concentración de etanol en la mezcla cosolvente favorecería las interacciones no polares entre el etanol y el flavonoide y 3) al aumentar la concentración de etanol, la polaridad de la mezcla disminuye hasta igualar la de la naringina ( $38,34 \text{ MPa}^{1/2}$ ).

En mezclas intermedias y ricas en etanol,  $0,50 \leq x_1 \leq 1,00$ ,  $\delta x_{1,3}$  vuelve a tener valores negativos indicando una hidratación preferencial. Delgado y Martínez [28] proponen que esta hidratación de las moléculas en mezclas ricas en cosolvente, se debe a que la fracción molar local de cosolvente en la esfera de solvatación depende de la polaridad del soluto, el cual promueve un entorno con una polaridad similar, razón por la cual la molécula de naringina tendería a hidratarse para aumentar la polaridad de la esfera de solvatación en mezclas cuya polaridad es menor de  $38,34 \text{ MPa}^{1/2}$ . Sin embargo, siendo más rigurosos en el análisis de los resultados de  $\delta x_{1,3}$ , es importante resaltar que en mezclas  $0,20 \leq x_1 \leq 0,40$  a todas las temperaturas y  $0,20 \leq x_1 \leq 0,50$  a  $293,15 \text{ K}$  y  $298,15 \text{ K}$  los valores de  $\delta x_{1,3}$  son muy próximos a  $0,01$  o menores a este valor, por lo que no es posible definir si la naringina se solvata o no por el etanol.

Tabla 9. Valores de  $100 \delta x_{1,3}$  de la naringina en mezclas cosolventes etanol + agua a diferentes temperaturas.

$x_1$	293,15 K	298,15 K	303,15 K	308,15 K	313,15 K
0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
0,10	-3,71	-3,13	-3,15	-2,96	-3,19
0,20	-1,19	-1,02	-0,90	-0,83	-0,81
0,30	1,15	1,02	0,75	0,66	0,54
0,40	1,22	0,99	0,28	0,09	0,26
0,50	-0,51	-0,72	-1,53	-1,69	-2,09
0,60	-3,39	-3,53	-4,00	-4,06	-4,24
0,70	-6,27	-6,40	-6,28	-6,24	-6,08
0,80	-6,60	-6,72	-6,28	-6,22	-5,93
0,90	-3,52	-3,43	-3,15	-3,05	-2,90
1,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

Finalmente, de acuerdo con los resultados de solvatación preferencial, es razonable suponer, que en mezclas de composición intermedia, la naringina actúa como ácido de Lewis con las moléculas de etanol, ya que este solvente es más básico que el agua, puesto que los parámetros de aceptor de enlace de hidrógeno de Kamlet-Taft son  $\beta = 0,75$  para el etanol y  $0,47$  para el agua [29]. Por otro lado, en mezclas ricas en agua y etanol,

en donde la naringina se hidrata preferentemente, está actuando principalmente como una base de Lewis frente al agua debido a que los parámetros de donantes de enlaces de hidrógeno de Kamlet-Taft son  $\alpha = 1,17$  para el agua y  $0,86$  para el etanol, respectivamente [30]. Así, el agua es más ácida que el etanol.

## CONCLUSIONES

De acuerdo con los valores del parámetro de solvatación preferencial, la naringina se hidrata preferentemente en mezclas ricas en agua y en mezclas ricas en etanol. Debido a que en las mezclas en donde  $\delta x_{1,3}$  es positivo, los valores del parámetro de solvatación preferencial son muy próximos a  $0,01$  o menores a este valor, no es posible definir si la naringina es solvatada o no por el etanol en estas mezclas cosolventes.

## REFERENCIAS

1. M. Cavia-Saiz, M.D. Busto, M.C. Pilar-Izquierdo, N. Ortega, M. Pérez-Mateos, P. Muniz, Antioxidant properties, radical scavenging activity and biomolecule protection capacity of flavonoid naringenin and its glycoside naringin: A comparative study, *J. Sci. Food Agric.*, **90**, 1238-1244 (2010).
2. G.C. Jagetia, T.K. Reddy, The grapefruit flavanone naringin protects against the radiation-induced genomic instability in the mice bone marrow: A micronucleus study, *Mutat. Res.*, **519**, 37-48 (2002).
3. D.H. Kim, E.A. Jung, I.S. Sohng, J.A. Han, T.H. Kim, M.J. Han, Intestinal bacterial metabolism of flavonoids and its relation to some biological activities, *Arch. Pharm. Res.*, **21**, 17-23 (1998).
4. P.C. Ho, D.J. Saville, P.F. Coville, S. Wanwimolruk, Content of CYP3A4 inhibitors, naringin, naringenin and bergapten in grapefruit and grapefruit juice products, *Pharm. Acta Helv.*, **74**, 379-385 (2000).
5. S.M. Jeon, Y.B. Park, M.S. Choi, Antihypercholesterolaemic property of naringin alters plasma and tissue lipids, cholesterol-regulating enzymes, fecal sterol and tissue morphology in rabbits, *Clin. Nutr.*, **23**, 1025-1034 (2004).
6. I. Erlund, Review of the flavonoids quercetin, hesperetin, and naringenin. Dietary sources, bioactivities, bioavailability, and epidemiology, *Nutr. Res.*, **24**, 851-874 (2004).

7. W.E. Acree Jr., J.H. Rytting, Solubility in binary solvent systems I: Specific versus nonspecific interactions, *J. Pharm Sci.*, **71**, 201-205 (1982).
8. A. Jouyban, M. Khoubnasabafari, W.E. Acree Jr., Predicting solubility of anthracene in non-aqueous solvent mixtures using a combination of Jouyban-Acree and Abraham models, *Chem. Pharm. Bull.*, **54**, 1124-1130 (2006).
9. W.E. Acree Jr., J.H. Rytting, Solubility in binary solvent systems. III: Predictive expressions based on molecular surface areas, *J. Pharm. Sci.*, **72**, 292-296 (1983).
10. W.E. Acree Jr., J.H. Rytting, Solubility in binary solvent systems. IV: Prediction of naphthalene solubilities using the UNIFAC group contribution model, *Int. J. Pharm.*, **13**, 197-204 (1983).
11. A. Martin, J. Newburger, A. Adjei, Extended Hildebrand solubility approach: Solubility of theophylline in polar binary solvents, *J. Pharm. Sci.*, **69**, 487-491 (1980).
12. E. Ruckenstein, I.L. Shulgin, Solubility of drugs in aqueous solutions: Part 1. Ideal mixed solvent approximation, *Int. J. Pharm.*, **260**, 193-201 (2003).
13. W.E. Acree Jr., Thermochemical investigations of preferential solvation in nonelectrolyte solutions. Estimation of preferential solvation from measured solute solubilities in binary solvent mixtures, *Phys. Chem. Liq.*, **22**, 107-119 (1990).
14. A. Ben-Naim, Preferential solvation in two- and in three-component systems, *Cell Biophys.*, **12**, 255-269 (1988).
15. I.L. Shulgin, E. Ruckenstein, Solubility and local structure around a dilute solute molecule in an aqueous solvent: From gases to biomolecules, *Fluid Phase Equilib.*, **260**, 126-134 (2007).
16. Y. Marcus, On the preferential solvation of drugs and PAHs in binary solvent mixtures, *J. Mol. Liq.*, **140**, 61-67 (2008).
17. K.E. Newman, Kirkwood-Buff solution theory: Derivation and applications, *Chem. Soc. Rev.*, **23**, 31-40 (1994).
18. Y. Marcus, "Solvent mixtures: Properties and selective solvation", Marcel Dekker, Inc., New York, 2002.
19. D.R. Delgado, F. Martínez, M.A.A. Fakhree, A. Jouyban, Volumetric properties of the glycerol formal + water cosolvent system and correlation with the Jouyban-Acree model, *Phys. Chem. Liq.*, **50**, 284-301 (2012).

20. J. Jiménez, J. Manrique, F. Martínez, Effect of temperature on some volumetric properties for ethanol + water mixtures, *Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm.*, **33**, 145-155 (2004).
21. R.F. Fedors, A method for estimating both the solubility parameters and molar volumes of liquids, *Polym. Eng. Sci.*, **14**, 147-154 (1974).
22. J. Zhang, P. Zhang, T. Liu, L. Zhou, L. Zhang, R. Lin, G. Yang, W. Wang, Y. Li, Solubility of naringin in ethanol and water mixtures from 283.15 to 318.15 K, *J. Mol. Liq.*, **203**, 98-103 (2015).
23. D.R. Delgado, E.F. Vargas, F. Martínez, Preferential solvation of xylitol in ethanol + water solvent mixtures according to the IKBI and QLQC methods, *Rev. Colomb. Quím.*, **42**, 59-66 (2013).
24. D.R. Delgado, M.A. Peña, F. Martínez, Preferential solvation of acetaminophen in ethanol + water solvent mixtures according to the inverse Kirkwood-Buff integrals method, *Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm.*, **42**, 298-314 (2013).
25. Z.J. Cárdenas, D.M. Jiménez, F. Martínez, Preferential solvation of ketoprofen in some co-solvent binary mixtures, *J. Solution Chem.*, **43**, 1904-1915 (2014).
26. D.M. Jiménez, Z.J. Cárdenas, D.R. Delgado, M.Á. Peña, F. Martínez, Preferential solvation of the antioxidant agent daidzein in some aqueous co-solvent mixtures according to IKBI and QLQC methods, *J. Appl. Sol. Chem. Mod.*, **4**, 110-118 (2015).
27. R.G. Sotomayor, D.R. Delgado, F. Martínez, Preferential solvation of naproxen and piroxicam in ethanol + water mixtures, *Bulg. Chem. Commun.* **47**, 571-577 (2015).
28. D.R. Delgado, F. Martínez. Preferential solvation of sulfadiazine, sulfamerazine and sulfamethazine in ethanol + water solvent mixtures according to the IKBI method, *J. Mol. Liq.*, **193**, 152-159 (2014).
29. M.J. Kamlet, R.W. Taft, The solvatochromic comparison method. I. The beta. scale of solvent hydrogen-bond acceptor (HBA) basicities, *J. Am. Chem. Soc.*, **98**, 377-383 (1976).
30. R.W. Taft, M.J. Kamlet, The solvatochromic comparison method. 2. The .alpha.-scale of solvent hydrogen-bond donor (HBD) acidities. *J. Am. Chem. Soc.*, **98**, 2886-2894 (1976).

## Estabilidad de gotas nasales de efedrina

Niurka Benítez<sup>1</sup>, Juan Manuel Cordoví<sup>2</sup>, Reynerio Zamora<sup>3</sup>, Pavel Cabrera<sup>4</sup>, Nilia de la Paz<sup>5</sup>, Mirna Fernández<sup>6</sup>

<sup>1-4</sup>Laboratorio Farmacéutico Líquidos Orales Bayamo (Medilip), Cuba.

Correos electrónicos: <sup>1</sup> niurka@medilip.biocubafarma.cu, <sup>2</sup> jm\_analist@medilip.biocubafarma.cu, <sup>3</sup> rey@medilip.biocubafarma.cu, <sup>4</sup> pavel@medilip.biocubafarma.cu.

<sup>5</sup> Centro de Investigación y Desarrollo de Medicamentos (Cidem). Correo electrónico: nilia.delapaz@cidem.sld.cu.

<sup>6</sup> Departamento de Tecnología y Control de los Medicamentos, Instituto de Farmacia y Alimentos (IFAL), Universidad de La Habana, calle 23 No. 21425 e/ 214 y 222, La Habana, Cuba. Teléfonos: 271-4075, 271-9534. \*Autor correspondiente, correo electrónico: mirnafc@ifal.uh.cu.

Recibido para evaluación: 2 de febrero de 2015.

Aceptado para publicación: 31 de julio de 2015.

### RESUMEN

En el presente trabajo se realizó el estudio de estabilidad de las gotas nasales de efedrina. Primero se evaluó la influencia de los agentes preservantes demostrándose la incompatibilidad del clorhidrato de efedrina y el clorobutanol, por lo que fue seleccionada la combinación de cloruro de benzalconio y edetato disódico con excelentes resultados en la efectividad de preservos. Se elaboraron tres lotes pilotos de la formulación y se les realizó los estudios de estabilidad por el método acelerado y de vida de estante, respectivamente. Durante los seis meses (estabilidad acelerada) y hasta los 24 meses (vida útil) las características organolépticas cumplieron con las especificaciones establecidas. El pH del medio se comportó de manera estable cumpliendo con los límites establecidos. El principio activo no alcanzó una degradación mayor al 5%, mostrando buena estabilidad. La concentración de los preservos cumplió con los parámetros, así como el conteo microbiano del producto terminado. La formulación envasada en frascos de vidrio ámbar de calidad hidrolítica III, de capacidad nominal 15 mL con tapa de polipropileno de 18 mm y gotero interior de polietileno de alta densidad, mostró adecuada estabilidad física, química y microbiológica durante 24 meses.

*Palabras clave:* clorhidrato de efedrina, gotas nasales, estabilidad, preservos antimicrobianos.

## SUMMARY

### Stability of ephedrine nasal drops

The subject of this paper is a stability study of ephedrine nasal drops. We started by assessing the influence of preservative agents in the stability of the formulation. Ephedrine hydrochloride was proven to be incompatible with chlorobutanol. This led the researchers to choose a combination of benzalkonium chloride and edetate disodium, which yielded excellent results in terms of effectiveness. Three pilot batches of the formulation were prepared, and stability studies were carried out under the accelerated and shelf-life methods. For the six-month period of the accelerated stability study and the 24-month period of the shelf-life study, organoleptic characteristics were within established acceptable limits. The pH of the medium also remained stable, within acceptable limits. The degradation of the active ingredient was not greater than 5%, which indicates good stability. The concentration of preservative agents and microbial count in the finished product were also within established parameters. The formulation was packaged in amber glass bottles of hydrolytic quality III and 15 mL nominal capacity, with an 18 mm polypropylene cap and an HDPE internal dropper, and it showed adequate physical, chemical and microbiological stability during the 24 months of the shelf life stability study.

*Key words:* Ephedrine hydrochloride, nasal drops, stability, preservative agents

## INTRODUCCIÓN

Es responsabilidad del fabricante, como parte del desarrollo de un producto farmacéutico, diseñar y realizar estudios de estabilidad adecuados, que permitan obtener una información segura y que demuestren cómo varía su calidad con una formulación y un envase determinado, durante el tiempo y bajo la influencia de las condiciones de almacenamiento a que es sometido, y como resultado del cual se apruebe un período de validez en el que pueda emplearse con absoluta seguridad.

La estabilidad se define como el período de tiempo durante el cual es posible mantener las propiedades físico-químicas, microbiológicas, terapéuticas y toxicológicas de un producto farmacéutico, cumpliendo con las especificaciones presentadas en la monografía con respecto a identidad, pureza, calidad y potencia [1, 2].

El estudio de estabilidad tiene como objetivo determinar en qué lapso y bajo qué condiciones el producto es satisfactorio, así como predecir la estabilidad a largo plazo con el fin,

esencialmente, de fijar una fecha de caducidad. Las condiciones del estudio y su duración deben ser suficientes para cubrir el almacenamiento, distribución y uso del fármaco [2-4]. Estos estudios contemplarán todos los índices susceptibles de cambiar durante el almacenamiento y que influyan sobre la calidad, seguridad o eficacia del medicamento, ya sea mediante ensayos organolépticos, físicos, químicos o microbiológicos. Los métodos de ensayo deben estar totalmente validados [5], y se incluirá información referente al contenido o efectividad de los preservos durante el período de validez [2-4].

El clorhidrato de efedrina, cuyo nombre químico es hidrocloreuro de (1R, 2S)-1-fenil-2-metilaminopropan-1-ol, es un broncodilatador adrenérgico, vasopresor, estimulante de los receptores beta-2 adrenérgicos en los pulmones para relajar el músculo liso bronquial, que alivia el broncoespasmo, aumenta la capacidad respiratoria, disminuye el volumen residual y reduce la resistencia de las vías aéreas [6]. Es empleado en la preparación de jarabes para el tratamiento del asma y resfriados por sus propiedades broncodilatadoras. También se incluye en gotas nasales o *sprays* descongestivos, ya que induce vasoconstricción sobre la mucosa nasal y disminuye la producción de moco. En su forma parenteral está indicado para contrarrestar los efectos hipotensores de la anestesia raquídea o de otros tipos de anestesia por conducción no tópica y la hipotensión aguda [6, 7].

En estudios previos se desarrollaron y validaron métodos analíticos para el análisis de las gotas nasales de efedrina. Los resultados de la validación mostraron que el método cromatográfico en fase reversa con detección UV-visible, para la determinación del clorhidrato de efedrina, así como los métodos volumétricos de valoración complejométrica, para la cuantificación del cloruro de benzalconio y edetato disódico, preservos antimicrobianos, fueron específicos, lineales, precisos y exactos; resultando confiables para su empleo en el control de calidad y estudio de estabilidad del producto terminado [8].

El presente estudio tiene como objetivo evaluar la estabilidad de una formulación de gotas nasales de efedrina, a través de los estudios de estabilidad acelerada y de vida de estante.

## METODOLOGÍA

### Productos químicos y reactivos

Clorhidrato de efedrina (Embio Limited, India), clorobutanol (Panreac, España), cloruro de benzalconio (Kirsch Ph, España) y edetato disódico 2 H<sub>2</sub>O (Panreac, España). El patrón de clorhidrato de efedrina lo suministró la Farmacopea Europea. El resto de los reactivos y soluciones fueron de calidad analítica (Merck, Alemania).



### Formulación de gotas nasales de clorhidrato de efedrina

Las gotas nasales estaban compuestas por clorhidrato de efedrina 10 mg/mL, tampón fosfato para regular el pH del medicamento y agua purificada como vehículo. Se evaluaron como preservos el clorobutanol y el cloruro de benzalconio combinado con edetato disódico. Las concentraciones empleadas para cada uno de los excipientes se encontraban en los rangos usuales para esta forma farmacéutica [9].

Una vez seleccionado el preservio adecuado, se elaboraron tres lotes pilotos de la formulación, de 20 L cada uno, identificados como 2002, 2003 y 2004, los que fueron envasados en frascos de vidrio ámbar de 15 mL con tapas de polipropileno de diámetro 18 mm y gotero interior de polietileno de alta densidad.

### Evaluación de la formulación

*Características organolépticas:* se transfirieron 25 mL de la muestra a un vaso para precipitados de 50 mL y se evaluaron el aspecto, el color y el olor. Se aceptaron líquidos transparentes, incoloros o ligeramente amarillos con ligero olor a cloruro de benzalconio.

*pH:* se transfirieron 30 mL de la muestra a un vaso de precipitado de 50 mL. Para la medición se utilizó un pH - metro Basic 20+ (Crison, España). La determinación se realizó por triplicado aceptando valores entre 4,0 y 7,0 [10].

Con el propósito de evaluar la influencia del agente preservante en la formulación, se realizó un estudio comparativo entre la preservada con clorobutanol y la que tenía la combinación de cloruro de benzalconio y edetato disódico. Para ello, ambas formulaciones se sometieron a incrementos de temperatura de 5 °C desde 35 °C a 90 °C, durante 1 h. Los valores de pH de las soluciones fueron determinados y se analizaron estadísticamente utilizando el programa profesional Statgraphics Plus 5.1 (Statistical Graphics Corp., EUA).

### Efectividad antimicrobiana

El estudio de efectividad antimicrobiana se realizó con la formulación seleccionada. El método aplicado fue el descrito en la USP 30 [11] donde las gotas nasales de clorhidrato de efedrina están clasificadas en la categoría 2, en función de la ruta de administración. Para el ensayo se emplearon las cepas de *C. Albicans* (ATCC 10231), *P. aeruginosa* (ATCC 27853), *S. aureus* (ATCC 65387) y *Escherichia coli* (ATCC 25922).

Las concentraciones finales de los inóculos se ajustaron con solución salina hasta 10<sup>7</sup> UFC/mL. Las suspensiones se cultivaron en Agar Triptona Soya por plaqueo directo, 24 h previas al ensayo verificando la viabilidad de los inóculos. Igual método se aplicó para determinar la carga microbiana al inicio, 14 y 28 días después de inoculados los

productos. Las formulaciones se inocularon con un volumen que garantizó una concentración entre  $10^5$  y  $10^6$  UFC/mL de cada uno de los microorganismos.

### **Conteo microbiano diferencial**

El conteo de hongos se realizó por el método de placa vertida y el conteo de bacterias se hizo por el método de tubos múltiples [11].

### **Métodos de análisis empleados**

La concentración del ingrediente farmacéutico activo (IFA) se determinó mediante un método cromatográfico en fase reversa con detección UV-visible, previamente validado [8], cuyas condiciones fueron: columna Nucleosil RP-18 100 Å ( $5\ \mu\text{m}$ ) 150 mm - 4,6 mm (Teknokroma, España), volúmenes de 5/95 de acetronilo y solución de ácido fosfórico al 2% como fase móvil, y velocidad de flujo de 1,0 mL/min. La longitud de onda empleada fue de 257 nm inyectándose 20  $\mu\text{L}$ . El procedimiento se realizó en un cromatógrafo líquido de alta resolución (Konik-Tech, España). El contenido del clorhidrato de efedrina debe encontrarse entre 9 y 11 mg/mL (90,0% - 110,0%) [10].

En el método volumétrico para la cuantificación del cloruro de benzalconio se usó el tetrafenilborato de sodio como valorante y el azul de bromofenol como indicador. En el método para el edetato disódico se empleó el sulfato de cinc como valorante y la ditizona como indicador. Ambos métodos se validaron previamente [8]. Se consideró adecuada la formulación si el contenido del cloruro de benzalconio se encontraba entre 0,09 y 0,11 mg/mL y entre 0,9 y 1,1 mg/mL de edetato disódico, de acuerdo con los criterios establecidos por el fabricante.

### **Estudio de estabilidad**

El estudio acelerado se realizó durante seis meses, con la evaluación de las muestras a tiempo inicial, 1, 3 y 6 meses. Los lotes se almacenaron a una temperatura de  $40 \pm 2\ ^\circ\text{C}$  y humedad relativa de  $75 \pm 5\%$ , según lo establecido por la Regulación 23 del Cecmed [2].

El estudio de estabilidad en vida de estante se realizó durante 24 meses, evaluando las muestras a los 6, 12, 18 y 24 meses. Los lotes se almacenaron a una temperatura de  $30 \pm 2\ ^\circ\text{C}$  y humedad relativa de  $70 \pm 5\%$  [2].

Durante el período del estudio se evaluaron las características organolépticas, pH, cuantificación del principio activo y los preservos, efectividad de preservos y el conteo microbiano diferencial. Para realizar el estudio, de acuerdo con la frecuencia de análisis establecida, se emplearon seis frascos por cada lote.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Como se conoce, uno de los aspectos a considerar en el diseño de las gotas nasales es el pH. Estas deben ser formuladas de manera que su instilación no lesione la integridad del epitelio nasal, y permitan que las funciones secretora y ciliar se realicen con normalidad. Lograr el mantenimiento del pH de la formulación implica el uso de los agentes reguladores de pH, y de los agentes preservantes para protegerlas del crecimiento de microorganismos al ser formas de dosificación no estériles.

La efedrina difiere de la mayor parte de los alcaloides por su solubilidad en agua, produciendo una solución que tiene fuerte reacción alcalina. Debido a esta alcalinidad, es incompatible con el clorobutanol y causa su descomposición con liberación de ácido clorhídrico [12]. El clorobutanol tiene actividad bacteriostática, la cual es reducida considerablemente a valores de pH mayores de 5,5. Su mayor estabilidad se logra a pH = 3; sin embargo, esta se ve afectada con el incremento del pH [9].

La figura 1 muestra los resultados obtenidos en el estudio comparativo pH *vs.* temperatura, según el agente preservante empleado en la formulación, mientras que en la tabla 1 aparecen los resultados del conteo de microorganismos como parte del estudio de efectividad de preservos de la formulación seleccionada.

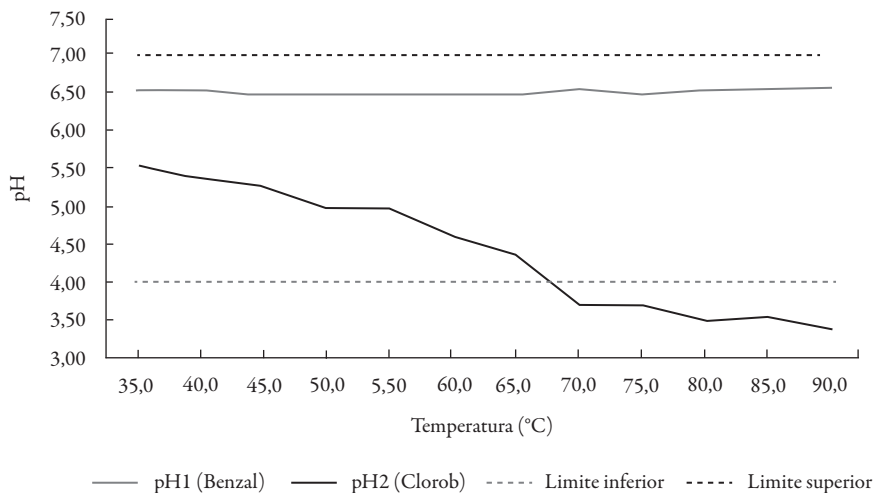


Figura 1. Estudio comparativo pH *vs.* temperatura de las formulaciones de gotas nasales de clorhidrato de efedrina con la combinación de cloruro de benzalconio y edetato disódico (pH1) y con clorobutanol (pH2).

Tabla 1. Efectividad de preservos de la formulación seleccionada.

Cepa de estudio	UFC/mL		
	Inicio	14 días	28 días
<i>C. albicans</i>	1,00E+07	1,00E+03	2,00E+03
<i>P. aeruginosa</i>	3,30E+07	1,00E+03	1,00E+02
<i>S. aureus</i>	4,00E+07	1,00E+03	1,00E+02
<i>E. coli</i>	1,00E+06	1,00E+03	1,00E+02

Bajo la influencia del incremento de la temperatura se demostró, en un corto período de tiempo, que efectivamente, como resultado de la incompatibilidad entre la efedrina y el clorobutanol, se produjo la disminución del pH y, por ende, la inefectividad del preservante. En contraste, con la combinación de cloruro de benzalconio y edetato disódico, se observó que el pH se mantuvo en el rango establecido para la formulación, acorde con el pH fisiológico de la mucosa nasal, demostrándose la efectividad del tampón empleado.

Por tanto, se corroboró la influencia del clorobutanol en la inestabilidad del pH de la formulación, a diferencia del comportamiento observado para la formulación preservada con cloruro de benzalconio y edetato disódico, favoreciendo la estabilidad del pH. De manera que la disminución del pH de las gotas nasales se produjo debido a la incompatibilidad ocurrida entre la efedrina y el clorobutanol.

Para analizar la normalidad de los datos de pH para ambas formulaciones, se aplicó el test de Shapiro-Wilks, cuyos valores de probabilidades resultaron mayores que 0,05, por lo que los datos cumplieron con una distribución normal para un intervalo de confianza del 95%. En el caso de la formulación con clorobutanol el *p*-valor fue de 0,12 y para la formulación con la combinación de preservos fue de 0,75. Al confirmar que los datos cumplían con una distribución normal, se realizó la prueba de homocedasticidad u homogeneidad de varianzas mediante el test de Fisher, teniendo como resultado que  $F = 2036,32$  y *p*-valor = 0,00. Teniendo en cuenta que el *p*-valor fue menor que 0,05, hubo diferencias significativas entre las varianzas de ambas muestras para un nivel de confianza del 95%; por tanto, se demostró que no hay homogeneidad de varianzas. Estos resultados confirmaron que los valores de pH obtenidos cuando se empleó el clorobutanol como preservos fueron estadísticamente diferentes a los estimados al usar

la combinación del cloruro de benzalconio y edetato disódico, con los cuales el pH del medicamento estuvo en el rango establecido (4,0 - 7,0) y acorde con el pH fisiológico de la mucosa nasal (6,4 - 6,8). Por tanto, se demostró que el uso del clorobutanol no brinda una adecuada conservación del producto, siendo la combinación del cloruro de benzalconio y el edetato disódico la más adecuada. Se seleccionó la formulación con estos agentes preservantes para los estudios de efectividad de preservos y escalada con vistas a realizar los estudios de estabilidad.

Los productos pertenecientes a la categoría 2 [11], deben mostrar una reducción de la carga microbiana inicial no menor de dos ciclos logarítmicos, a los 14 días de inoculado. Además, se espera que no ocurra un incremento en el conteo de viables desde los 14 días hasta el día 28, después de la inoculación del producto. Para el caso de los hongos y levaduras, se espera que no ocurra un incremento en el conteo de viables desde el inicio, ni a los 14 ni a los 28 días a partir de la inoculación del producto.

La formulación seleccionada mostró una reducción de la carga microbiana mayor que la esperada a los 14 días de ensayo y ningún incremento a los 28 días, excepto para la *C. albicans*. No obstante, se observa que este no es significativo, considerando la reducción alcanzada respecto a la carga inicial inoculada, así como para el resto de las especies ensayadas, por lo que se cumplió la prueba de efectividad de preservos.

El edetato disódico actúa sobre la pared celular provocando la remoción de iones  $Mg^{++}$  y la liberación de polisacáridos. La pared celular de la *E. coli* (bacteria Gram negativa) presenta una capa de lipopolisacáridos por encima de la capa del peptidoglicano, que protege a la bacteria de la acción del preservativo antimicrobiano. El edetato disódico actúa sobre la pared celular abriendo una brecha que favorece la entrada del cloruro de benzalconio para que este actúe sobre la membrana celular provocando la muerte del microorganismo [13, 14]. La concentración del edetato disódico empleada permitió que ocurriera el fenómeno descrito favoreciendo la destrucción de la pared celular de la *E. coli* y la *C. albicans*, por lo que el cloruro de benzalconio actuó sinérgicamente en su sitio de acción para provocar la destrucción de los microorganismos.

Los excelentes resultados obtenidos en el escalado piloto de la formulación seleccionada, recién elaborada, demostraron la consistencia del proceso tecnológico desarrollado.

Los resultados del estudio de estabilidad acelerada correspondientes a los lotes pilotos se resumen en la tabla 2, mientras que los de vida útil en la tabla 3.

Tabla 2. Estudio de estabilidad acelerada.

Parámetros	Frecuencia (mes)	Lotes		
		2002	2003	2004
Características organolépticas	Inicial	Conforme	Conforme	Conforme
	1	Conforme	Conforme	Conforme
	3	Conforme	Conforme	Conforme
	6	Conforme	Conforme	Conforme
pH	Inicial	6,57	6,57	6,59
	1	6,57	6,57	6,58
	3	6,50	6,50	6,50
	6	6,49	6,49	6,48
Concentración de clorhidrato de efedrina (mg/mL)	Inicial	10,53	10,49	10,54
	1	10,52	10,48	10,53
	3	10,49	10,45	10,49
	6	10,34	10,34	10,32
Concentración de cloruro de benzalconio (mg/mL)	Inicial	0,103	0,103	0,103
	1	0,103	0,103	0,103
	3	0,099	0,102	0,099
	6	0,099	0,100	0,099
Concentración de edetato disódico (mg/mL)	Inicial	1,10	1,10	1,10
	1	1,10	1,10	1,10
	3	1,10	1,09	1,09
	6	1,10	1,07	1,07
Conteo microbiano	Inicial	Conforme	Conforme	Conforme
	6	Conforme	Conforme	Conforme
Efectividad de preservo	Inicial	Conforme	Conforme	Conforme
	6	Conforme	Conforme	Conforme

Durante los seis meses de estudio acelerado, los tres lotes se mantuvieron como líquidos transparentes, incoloros o ligeramente amarillos, con ligero olor a cloruro de benzalconio. El pH del medio se comportó de manera estable y el principio activo no marcó una degradación mayor al 5%, con valores de 1,9%, 1,5% y 2,2%, respectivamente, por lo se consideró un cambio no significativo derivado de las condiciones de almacenamiento estudiadas [2]. De forma similar se comportó la concentración de los preservativos

antimicrobianos. El conteo microbiano y la efectividad de preservos demostraron la efectividad de los mismos en la protección antimicrobiana de la formulación.

En 24 meses de estudio, las características organolépticas se mantuvieron dentro de los límites de aceptación establecidos. El pH del medio se comportó de manera estable cumpliendo con los límites establecidos. El principio activo no alcanzó una degradación mayor al 5% en ninguno de los tres casos, mostrando buena estabilidad [2].

La concentración de los preservos se mantuvo en los límites establecidos. Los análisis correspondientes al conteo microbiano ofrecieron resultados acordes con lo requerido para su aceptación, así como su cuantificación. Al mismo tiempo, se demostró la utilidad del sistema envase-cierre seleccionado para las gotas nasales. Desde el punto de vista de la calidad química, como la disminución del contenido del ingrediente farmacéutico activo y los agentes preservantes en el tiempo fue inferior al 5% [2], y se encuentran en el límite establecido, se considera que la formulación de gotas nasales de efedrina es estable en las condiciones de envase y almacenamiento estudiadas.

Tabla 3. Estudio de estabilidad útil.

Parámetros	Frecuencia (mes)	Lotes		
		2002	2003	2004
Características organolépticas	Inicial	Responde	Responde	Responde
	6	Responde	Responde	Responde
	12	Responde	Responde	Responde
	18	Responde	Responde	Responde
	24	Responde	Responde	Responde
pH	Inicial	6,57	6,57	6,59
	6	6,50	6,49	6,48
	12	6,56	6,56	6,55
	18	6,45	6,45	6,45
	24	6,43	6,44	6,44

(Continúa)

Tabla 3. Estudio de estabilidad útil (*continuación*).

Concentración de clorhidrato de efedrina (mg/mL)	Inicial	10,53	10,49	10,54
	6	10,41	10,40	10,41
	12	10,23	10,29	10,01
	18	10,16	10,21	9,99
	24	10,05	10,11	9,89
Concentración de cloruro de benzalconio (mg/mL)	Inicial	0,103	0,103	0,103
	6	0,099	0,103	0,099
	12	0,099	0,102	0,099
	18	0,099	0,099	0,098
	24	0,098	0,098	0,097
Concentración de edetato disódico (mg/mL)	Inicial	1,10	1,10	1,10
	6	1,10	1,10	1,10
	12	1,10	1,10	1,10
	18	1,10	1,10	1,10
	24	1,00	1,00	1,00
Conteo microbiano	Inicial	Conforme	Conforme	Conforme
	12	Conforme	Conforme	Conforme
	24	Conforme	Conforme	Conforme

## CONCLUSIONES

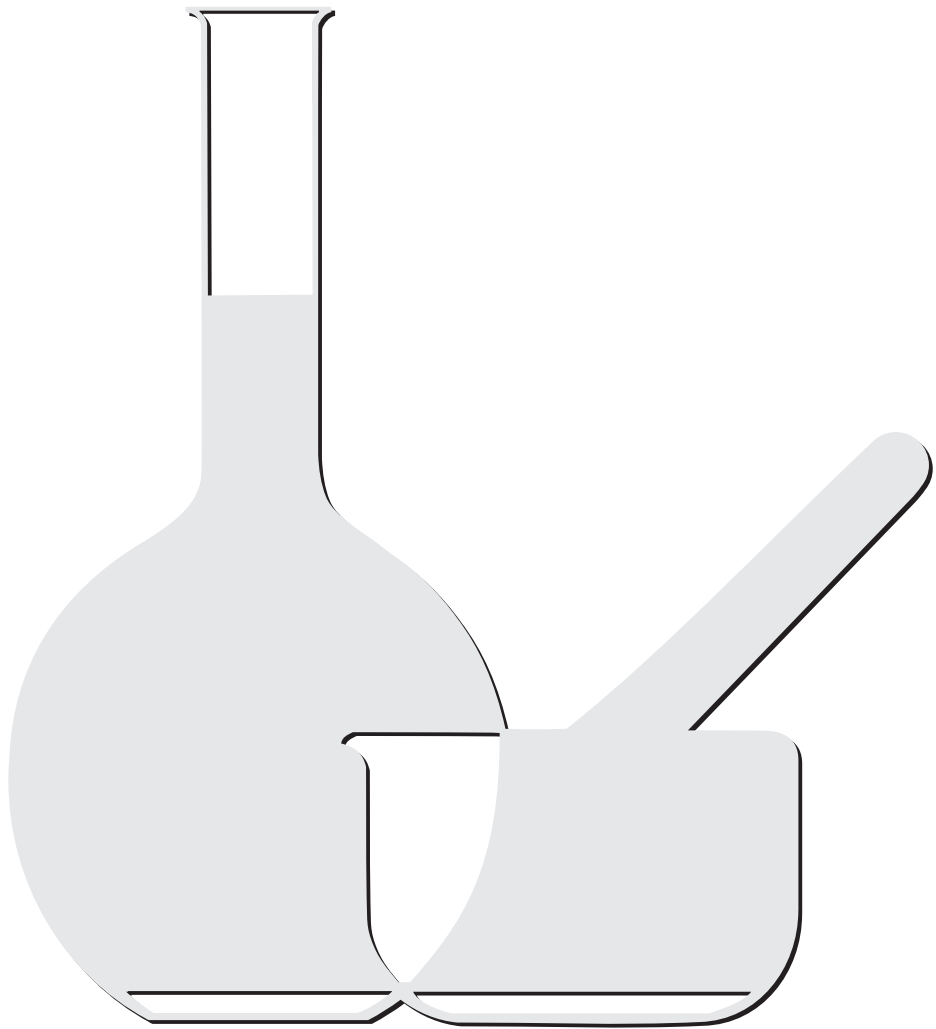
A partir de los resultados obtenidos en el estudio de estabilidad, se concluyó que la formulación de gotas nasales de efedrina, empleando la combinación de cloruro de benzalconio y edetato disódico como preservantes microbianos, mantuvo estables sus características físicas, químicas y microbiológicas durante los 24 meses en el material de envase propuesto: frascos de vidrio ámbar de 15 mL con tapa de polipropileno y gotero interior de polietileno de alta densidad.



## REFERENCIAS

1. T. S. Lin, Ch.W. Chen, Overview of stability study design, *Journal of Biopharmaceutical Statistics*, **13**(3), 337 (2003).
2. Regulación No. 23-2000, “Requerimientos de los estudios de estabilidad para el registro de productos farmacéuticos nuevos y conocidos”, Centro Estatal para el Control de Medicamentos (Cecmed), Cuba, 2000.
3. World Health Organization, “Guidelines for stability testing of pharmaceutical products containing well establish drug substance in conventional dosage forms”, Expert Committee on Specifications for Pharmaceutical Preparations, Thirty first Report, WHO Technical Report, Geneva, 1996.
4. USP35-NF30, United States Pharmacopeia (USP 35), The United States Pharmacopeial Convention, Inc., Washington, D. C., 2012, pp. 176, 253.
5. Regulación No. 41, “Validación de métodos analíticos”, Centro Estatal para el Control de Medicamentos (Cecmed), Cuba, 2007.
6. British National Formulary (47 Ed.), Joint Formulary Committee, British Medical Association and Royal Pharmaceutical Society of Great Britain, London, 2004.
7. Formulario Nacional de Medicamentos 2011. Departamento de Farmacoepidemiología. Minsap. La Habana, Cuba. URL: <http://bvscuba.sld.cu/libros-de-autores-cubanos/listado-de-titulos-en-orden-alfabetico/>. Consultado en diciembre de 2014.
8. N. Benítez, J.M. Cordoví, M. Fernández, R. Zamora, N. de la Paz, P. Cabrera, Validación de métodos analíticos aplicables al control de calidad y estudio de estabilidad de las gotas nasales de efedrina, *Ars Pharmaceutica*, **55**(3), 11 (2014).
9. R.C. Rowe, P.J. Sheskey, M.E. Quinn, “Handbook of pharmaceutical excipients”, 6<sup>th</sup> edition, Pharmaceutical Press and American Pharmacists Association, London, 2009.
10. British Pharmacopeia 2010. Versión 13.0. Data© Crown Copyright 2010. Londres, 2010 (versión electrónica).
11. USP30-NF25, United States Pharmacopeia (USP 30), The United States Pharmacopeial Convention, Inc., Rockville, Md., 2007 (versión electrónica).

12. R. Ugarte, J.L. Bello, "Texto para la formación del técnico en farmacia dispensarial. Farmacotecnia", Editorial Pueblo y Educación, La Habana, 1990.
13. C.E. Cabrera, F. Gómez, A. Zúñiga. La resistencia de las bacterias a antibióticos, antisépticos y desinfectantes, una manifestación de supervivencia y adaptación, *Colombia Médica*, **38**(2), 49 (2007).
14. J. Y. Leveau, M. Bouix, "Manual técnico de higiene, limpieza y desinfección", Mundi Prensa, Madrid, 2002, p. 623.



## NORMAS PARA PUBLICACIÓN

La Revista Colombiana de Ciencias Químico Farmacéuticas es editada por el Departamento de Farmacia de la Universidad Nacional de Colombia (sede Bogotá), con una periodicidad cuatrimestral y tiene como objetivo publicar artículos originales de diversos tópicos relacionados con las ciencias farmacéuticas, tales como recursos naturales, atención farmacéutica, evaluación clínica y preclínica, y los relacionados con la industria farmacéutica, la salud y los medicamentos.

Además de artículos completos, la revista acepta revisiones, comunicaciones breves y cartas al editor. Las contribuciones pueden enviarse en español, portugués o inglés, en letra Times New Roman, tamaño 12, por triplicado (original y dos copias) junto con una copia en medio magnético especificando el procesador de textos utilizado.

Todo el material propuesto para publicación será revisado por el comité editorial, y luego de su aceptación para evaluación, será sometido a revisión por pares académicos. Las evaluaciones recibidas por el comité editorial serán remitidas al autor para que se realicen los ajustes sugeridos. Los autores tendrán un lapso de tres semanas para responder cada una de las observaciones, introducir en el texto las modificaciones del caso y retornar el documento corregido al comité editorial. Después de que los evaluadores y/o el comité editorial lleven a cabo

una segunda revisión del manuscrito, la revista comunicará a los autores la decisión sobre la publicación o no del mismo. Los originales de los artículos permanecerán en los archivos de la Revista por un año. Los manuscritos deberán acompañarse de una carta firmada por todos los autores en la cual se declare que el trabajo es inédito; es decir, que el artículo ni parte de él ha sido publicado o está en vía de publicación en otra revista, y en la que se responsabilizan por la información publicada. Se entiende claramente que los trabajos enviados no están siendo considerados para su publicación en otros medios. Siempre que se acepte un trabajo para publicación, el autor principal recibirá sin costo tres ejemplares del número de la revista correspondiente.

Los manuscritos deben ir a doble espacio, incluyendo tablas, con un mínimo de 2,5 cm de margen por todos los lados. No se admiten notas a pie de página.

Todos los manuscritos deben incluir:

- Título, centrado y minúscula.
- Autor(es), cursiva, izquierda, incluyendo dirección postal completa, correo electrónico y fax.
- Resumen y Summary. Al principio del manuscrito y con título centrado. Incluye la justificación del estudio y los principales hallazgos y conclusiones, debe tener entre 50 y 200 palabras. Incluir además el título del artículo y el resumen en inglés (Summary) independiente del idioma del manuscrito.

- Palabras clave (debajo del Resumen) y Key words (debajo de Summary). De tres a seis palabras en minúscula, excepto la primera, y separadas por coma y espacio. Preferiblemente tomadas del Index Medicus (<http://www.nlm.nih.gov/mesh/meshhome.htm>).

Los artículos se dividirán en las siguientes secciones: introducción, metodología, resultados y discusión, agradecimientos y referencias. Los títulos deben estar separados por dos espacios en sus partes superior e inferior, centrados y en negrilla. Los detalles acerca de la metodología experimental utilizada deberán ser lo suficientemente claros como para repetir la experimentación.

Las tablas deben llevar numeración arábiga de acuerdo con el orden de aparición en el texto. El título debe ir en su parte superior y las notas en la parte inferior. En los encabezamientos de las columnas se deben anotar los símbolos de las unidades utilizadas. Las fotografías, gráficas, dibujos y esquemas se denominan 'figuras' y deben llevar numeración arábiga de acuerdo con el orden de aparición en el texto. El título debe ir debajo de la figuras.

Los artículos relacionados con experimentación con animales deben ajustarse plenamente a los lineamientos éticos trazados por la Organización Mundial de la Salud. Los extractos o fracciones evaluados *in vitro* o *in vivo* deben definirse químicamente, cuando menos en cuanto a la clase de constituyente. El material vegetal deberá estar clasificado botánicamente.

Las abreviaturas de pesos y medidas serán las indicadas por la Farmacopea de los Estados Unidos en su edición oficial o unidades SI.

Los datos espectroscópicos se deben presentar de la siguiente manera:

UV  $\lambda$  max (solvente  $\epsilon$ ) nm (log  $\epsilon$ ). Ej.: UV  $\lambda$  max (MeOH) 275 (log  $\epsilon$  2.94).

IE  $\nu$  max (medio)  $\text{cm}^{-1}$ . Ej.: ir  $\nu$  max (KBr) 1740, 1720  $\text{cm}^{-1}$ .

EM  $m/z$  (% intensidad relativa). Ej.: em  $m/z$  (%): 340 ( $M^+$ , 100), 295 (10), 134 (26) ...

RMN  $^1\text{H}$  (solvente, frecuencia de registro)  $\delta$  ppm (integración, multiplicidad, J en Hz, asignación). Ej.: RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz) 3.84 (1H, *d*, J = 10.3 Hz, H-30).

RMN  $^{13}\text{C}$  (solvente, frecuencia de registro)  $\delta$  ppm (multiplicidad, asignación). Ej.: RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 600 MHz) 16.60 (*t*, C-12).

Las abreviaturas usadas para describir la multiplicidad de las señales en RMN son: *s* = singlete, *d* = doblete, *t* = triplete, *m* = multiplete, *dd* = doble de dobletes, *ddd* = doble de doble de dobletes.

Las abreviaturas para los solventes y reactivos más comúnmente usados son: EtOH = etanol, MeOH = metanol,  $\text{CHCl}_3$  = cloroformo,  $\text{C}_6\text{H}_6$  = benceno, AcOEt = acetato de etilo, EP = éter de petróleo,  $\text{Me}_2\text{CO}$  = acetona, DMSO = dimetilsulfóxido, AcOH = ácido acético.

Se evitará el uso excesivo de tablas y figuras que estarán numeradas y que se anexarán en hojas separadas con su respectiva descripción.

Las referencias se citarán en el texto con su respectiva numeración. Solo se pueden citar tesis y libros o artículos que hayan sido publicados. Deben incluir: autor(es), título de la publicación, año, volumen y páginas, de la siguiente manera:

Revistas: Iniciales del nombre y apellido completo de todos los autores, título completo del artículo, nombre abreviado o nombre completo de la revista dependiendo si aparece en el Chemical Abstract o en índices equivalentes. La referencia se cita en letra itálica, volumen en negrilla, página inicial y año entre paréntesis. Ej.:

1. H.P. Baden, L.A. Goldsmith, B. Fleming, A comparative study of... keratinized tissues, *Bioch. Biophys. Acta*, 322, 269 (1973).

Comunicaciones personales: Iniciales del nombre, apellido completo e institución, seguido por las palabras comunicación personal y el año. Ej.:

2. A.J.M. Leeuwenberg, Agricultural University, Wageningen, Holanda, comunicación personal, 1984.

Libros: Iniciales del nombre y apellido completo de los autores, título del libro

entre comillas, editorial, ciudad, año, volumen y página. Ej.:

3. D.R. Morris, "The Biochemistry of Disease", Morris et Marton Eds., London, 1981, Vol. 8, p. 223.

Capítulos de libros escritos por varios autores: Iniciales del nombre y apellido completo del autor del capítulo seguido de la palabra En, título del libro entre comillas, editores, editorial, ciudad, año, volumen, páginas. Ej.:

4. A.D. Elbein, R.J. Molyneux. En "Alkaloids: Chemical and Biological Perspectives", Ed. por S.W. Pelletier, Wiley, New York, 1987, Vol. 5, pp. 1-54.

Tesis: Autores, título seguido de la palabra Tesis de..., institución, año, páginas. Ej.:

5. F. Salcedo, "Contribución al estudio de las Cinchonas colombianas", Tesis de Grado, Universidad del Valle, 1983, pp. 14-16.

Referencias de Internet: Inicial del nombre y apellido completo del autor, título del documento, dirección URL y fecha de revisión. Ej.:

6. Lipidat. Lipid thermotropic phase transition database. Ohio State University. URL: <http://www.lipidat.chemistry.ohio-state.edu>, consultado en septiembre de 2001.

La correspondencia debe enviarse a la siguiente dirección:

**Comité Editorial**

Revista Colombiana de Ciencias  
Químico-Farmacéuticas  
Departamento de Farmacia -  
Facultad de Ciencias  
Universidad Nacional de Colombia

Cra. 30 No. 45-03  
Fax: 57-1-3165060  
Bogotá - Colombia  
Dirección electrónica:  
[rcciquifa\\_fcbog@unal.edu.co](mailto:rcciquifa_fcbog@unal.edu.co)

Dirección WEB:

<http://www.farmacia.unal.edu.co/?itpad=182&niv=1&itact=182&ti=true&dep=4>

Igualmente, los manuscritos pueden enviarse al correo electrónico:  
[rcciquifa\\_fcbog@unal.edu.co](mailto:rcciquifa_fcbog@unal.edu.co)

*Revista Colombiana*  
*de Ciencias Químico-Farmacéuticas, 44(2)*  
se terminó de imprimir y encuadernar  
en Proceditor, sobre papel bond de 90 gramos  
Bogotá, D. C., Colombia.