



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(3), diciembre 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: rciquifa_fcboq@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 (E): Jaime Aguirre Ceballos, 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. Irache, 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.

Víctor 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.

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

Maria 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:

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

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

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.

José M. Lozano, Ph. D., Departamento de Farmacia, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, D. C., Colombia.

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

Romina Glisoni, Ph. D., Departamento de Tecnología Farmacéutica, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires, Argentina.

Yady J. Manrique, Ph. D., School of Pharmacy, The University of Queensland, Brisbane, Australia.

Edición, corrección de estilo, armada electrónica e impresión: Procceditor Ltda., Bogotá. Teléfonos: 757 9200. Fax: ext. 102. procceditor@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

Study of some properties of cyanopyridine derivatives in solutions Shipra Baluja, Jagdish Movalia	259
Postural hypotension associated with inappropriate choice of drug treatment of benign prostatic hyperplasia Camilo Domínguez-Domínguez, Carlos Calderón-Ospina	276
Análisis comparativo de la cinética de liberación de diclofenaco sódico a partir de matrices hidrofílicas en medios de disolución convencionales y biorrelevantes Plinio A. Sandoval, Ali Rajabi-Siahboomi, Luisa Fernanda Ponce D'León	282
Determinación de hidroquinona usando un electrodo de carbono vítreo modificado con quitosano, nanotubos de carbono de pared múltiple y líquido iónico. Posible uso como sensor Laura Scarpetta, Adrián Mariño, Karen Bolaños, Yaritza Leiva, Paola Castiblanco, Édgar Nagles	311
Usos terapéuticos potenciales de los antagonistas opioides: Fisiopatología y evidencia preclínica Mauricio O. Nava-Mesa, Angélica Téllez-Arévalo, Daniel Rojas-Kozhakin, Carlos A. Calderón-Ospina	322
Novel gel-like microemulsion for topical delivery of Amphotericin B Claudia Salerno, Susana Gorzalczany, Alicia Arechavala, Silvia L. Scioscia, Adriana M. Carlucci, Carlos Bregni	359
Estudio matemático de estabilidad del estado estacionario del desempeño del electrodo de la pasta de carbono, químicamente modificado por un líquido iónico, en la cuantificación del galato de propilo Volodymyr V. Tkach, Valdir Souza Ferreira, Reza Ojani, Michel O. Galeano Espínola, Petró I. Yagodynets, Márcia H. de Rizzo da Matta	382
Economic impact of vaccination with PCV13 vs. vaccination with PCV 10 in Colombia Jorge Díaz, José Urrego, Alexander Moreno, Juan Reyes, Fernando Peralta, Víctor Prieto, Paul Brown	397
Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm., Vol. 44, números 1 a 3, 2015 Índice general por tipo de artículos	416

Study of some properties of cyanopyridine derivatives in solutions

Shipra Baluja¹, Jagdish Movalia

Department of Chemistry, Saurashtra University, Rajkot- 360 005, Gujarat, India.

¹E-mail: shipra_baluja@rediffmail.com.

Recibido para evaluación: 25 de julio de 2015.

Aceptado para publicación: 8 de septiembre de 2015.

SUMMARY

Some new cyanopyridine derivatives have been synthesized and their characterization was done by IR, ¹H NMR and mass spectral data. Further, some physicochemical properties such as density, refractive index, conductance etc. have been studied for these synthesized compounds, in different solvents at 308.15 K.

Key words: Cyanopyridine derivative, conductance, refractive index, density.

RESUMEN

Estudio de las propiedades de algunos derivados de cianopiridina en solución

Se sintetizaron algunos derivados de cianopiridina y se caracterizaron mediante IR, RMN ¹H y espectrometría de masa. Además, para los mismos compuestos se determinaron algunas propiedades fisicoquímicas tales como densidad, índice de refracción y conductancia, en diferentes solventes a 308,15 K.

Palabras clave: derivados de cianopiridina, conductancia, índice de refracción, densidad.

INTRODUCTION

The pyridine ring is an integral part of various natural products of therapeutic importance. It plays an important role in catalyzing both biological and chemical reactions [1].

Substituted cyanopyridines are known to act as intermediates in the pharmaceutical, dye, photo and agrochemical industries [2-4]. Further, Many fused cyanopyridines have drawn attention due to their wide spectrum biological activities [5-9]. Therefore, the synthesis of cyanopyridine derivatives continues to attract much interest in organic chemistry. However, best of our knowledge, very little work is known for their physicochemical properties.

In view of these observations and with a view to study physicochemical properties of this class of compounds, the present study includes synthesis and studies of some physicochemical properties such as density, refractive index and conductance of synthesized cyanopyridines in solutions.

EXPERIMENTAL

Equipments and Reagents used

1-naphthyl amine, acetic anhydride, POCl_3 , malono nitrile, ammonium acetate and different substituted acetophenone used for the synthesis, were supplied from Spectrochem Pvt. Ltd. (Mumbai, India) and were used without any treatment.

The DMF and DMSO used were of AR grade supplied by Spectrochem Pvt. Ltd. (Mumbai, India) and were purified according to the standard procedure [10]. The distilled solvents were stored over molecular sieves. The purity of solvents were confirmed by GC-MS (SHIMADZU-Model No.-QP-2010) equipped with column (DB-5MS, 25 m in length, 0.20 mm internal diameter and 0.33 μm film) and was found to be about 99.99%.

The pycnometer and Abbe refractometer were used for the measurement of density and refractive index of solutions of compounds respectively. For the measurement of conductance of solutions, Equip-tronics conductivity meter (Model No. 664) was used.

Synthesis

[A] *Synthesis of N-(naphthalene-1-yl)acetamide*: Equimolar mixture of 1-naphthyl amine and acetic anhydride in methanol was refluxed in water bath for 2-3 hrs using acetic acid as catalyst. The crude product was isolated and crystallized from absolute ethanol.

[B] *Synthesis of 2-chloro benzo[h]quinoline-3-carbaldehyde*: N-(naphthalene-1-yl) acetamide was added in a mixture of Vilsmeier-Haack reagent (prepared by drop wise addition of 6.5 ml POCl_3 in ice cooled 2 ml DMF) and refluxed for 27 hrs. The reaction mixture was poured into ice and kept for overnight followed by neutralization using sodium bicarbonate. The crude product was isolated and crystallized from ethanol.

[C] *Synthesis of 3-(2-chlorobenzo[h]quinolin-3-yl)-1-(4-methoxy-phenyl)prop-2-en-1-one*: To a well stirred solution of 2-chloro benzo[h]quinoline-3-carbaldehyde and p-methoxy-acetophenone in binary mixture of ethanol + DMF, 40% NaOH was added till the solution became basic. The reaction mixture was stirred for 48 hrs and the contents were poured into ice, acidified, filtered and crystallized from ethanol.

[D] *Synthesis of 2-amino-4-(2-chlorobenzo[h]quinolin-3-yl)-6-(4-methoxy-phenyl)pyridine-3-carbonitrile(CP-1)*: A mixture of 3-(2-chlorobenzo[h]quinolin-3-yl)-1-(4-methoxy-phenyl) prop-2-en-1-one, malononitrile and ammonium acetate in ethanol was refluxed for 10-12 hrs. The content was poured on crushed ice. The product obtained was filtered, washed with water and crystallized from DMF.

Similarly, other substituted cyano pyridines have been prepared.

Figure 1 shows the reaction scheme. The structures of all the synthesized compounds were confirmed by IR, ^1H NMR and mass spectral data. The IR spectra were recorded by SHIMADZU-FTIR-8400 Spectrophotometer in the frequency range of $4000\text{--}400\text{ cm}^{-1}$ by KBr powder method. The NMR spectra were recorded by BRUKER Spectrometer (400 MHz) using internal reference TMS and solvent $\text{CDCl}_3/\text{DMSO}$. The Mass spectra were recorded by GCMS-SHIMADZU-QP2010.

Table 1 shows the physical parameters of synthesized cyanopyridine compounds.

Table 1. Physical constants of synthesized Cyanopyridine compounds.

Sr. No.	Comp. Code	Mol. Wt. (g/mol)	M.F.	R	R_f^* Value	M.P. ($^{\circ}\text{C}$)	Yield %
1	CP-1	436.8	$\text{C}_{27}\text{H}_{17}\text{ClN}_4\text{O}$	4- $\text{OCH}_3\text{-C}_6\text{H}_4\text{-}$	0.59	221	70
2	CP-2	420.8	$\text{C}_{26}\text{H}_{17}\text{ClN}_4$	4- $\text{CH}_3\text{-C}_6\text{H}_4\text{-}$	0.56	180	68
3	CP-3	485.7	$\text{C}_{25}\text{H}_{14}\text{BrClN}_4$	4- $\text{Br-C}_6\text{H}_4\text{-}$	0.63	214	71
4	CP-4	421.8	$\text{C}_{25}\text{H}_{16}\text{ClN}_5$	4- $\text{NH}_2\text{-C}_6\text{H}_4\text{-}$	0.69	208	65
5	CP-5	451.8	$\text{C}_{25}\text{H}_{14}\text{ClN}_5\text{O}_2$	4- $\text{NO}_2\text{-C}_6\text{H}_4\text{-}$	0.64	187	69
6	CP-6	422.8	$\text{C}_{25}\text{H}_{15}\text{ClN}_4\text{O}$	3- $\text{OH-C}_6\text{H}_4\text{-}$	0.70	235	67
7	CP-7	441.3	$\text{C}_{25}\text{H}_{14}\text{Cl}_2\text{N}_4$	4- $\text{Cl-C}_6\text{H}_4\text{-}$	0.72	234	72
8	CP-8	451.8	$\text{C}_{25}\text{H}_{14}\text{ClN}_5\text{O}_2$	3- $\text{NO}_2\text{-C}_6\text{H}_4\text{-}$	0.62	201	63
9	CP-9	422.8	$\text{C}_{25}\text{H}_{15}\text{ClN}_4\text{O}$	4- $\text{OH-C}_6\text{H}_4\text{-}$	0.67	229	65
10	CP-10	406.8	$\text{C}_{25}\text{H}_{15}\text{ClN}_4$	H- $\text{C}_6\text{H}_4\text{-}$	0.49	162	73

*Ethyl acetate : Hexane: 3:7.

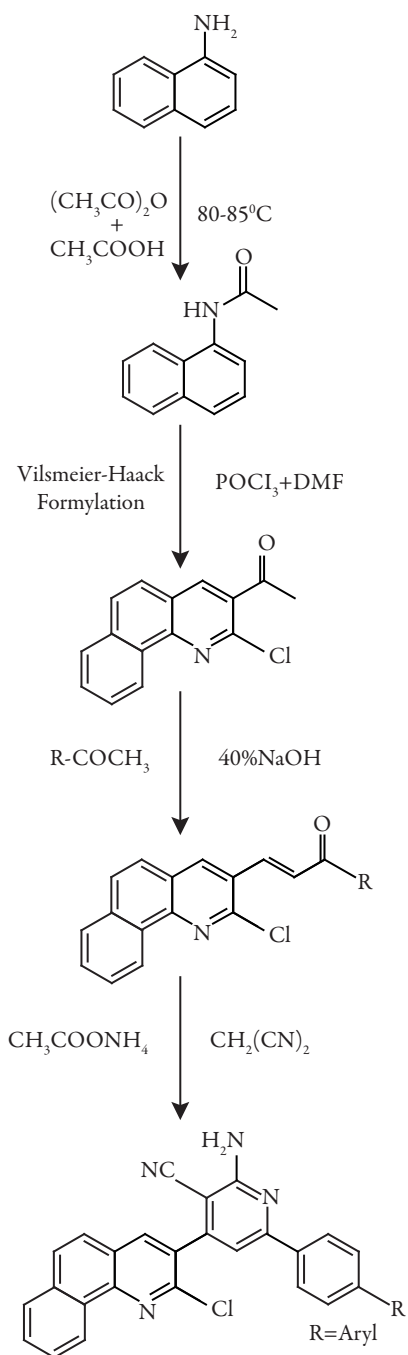


Figure 1. Reaction Scheme.

Physicochemical studies

Density and refractive index: The density and refractive index of all the synthesized cyanopyridine derivatives have determined in dimethylformamide and dimethyl sulfoxide solutions at 298.15 K. The density and refractive index were measured at definite temperature by pycnometer and Abbe refractometer respectively. The temperature was maintained by circulating water through jacket around the prisms of refractometer from an electronically controlled water bath (NOVA NV-8550 E). The uncertainty of temperature was ± 0.1 °C and that of density and refractive index was ± 0.0001 g/cm³ and 0.0005 respectively.

Conductance: For all the synthesized compounds, conductance is measured in dimethylformamide and dimethylsulfoxide solutions at 298.15 K. The conductance of each solution was measured by using Equip-tronics conductivity meter (Model No. 664) having a cell constant 0.98 cm⁻¹ at 298.15 K.

RESULTS AND DISCUSSION

In all 10 compounds were synthesized and IR, NMR and mass spectral data analysis confirmed their molecular structure. The IR, NMR and mass spectra of CP-1 are shown in Figures 2, 3 and 4 respectively. The spectral data are given below:

CP1: IR (KBr, cm⁻¹): N-H: 3314, C=C: 1514, C≡N: 2195, C-Cl: 690.

¹H NMR (δ ppm): 3.83(s, 3H), 3.49 (s, 2H), 7.09-7.12(d, 2H), 7.5-7.54(t, 1H), 7.66-7.76(dd, 2H), 7.83-7.99(m, 2H), 8.07-8.10(m, 2H), 8.37(s, 1H), 8.51(d, 2H).

m/z: 436.8, 422, 402, 385, 357, 338, 295, 247, 226, 218, 151, 108, 92, 78.

CP2: IR (KBr, cm⁻¹): N-H: 3348, C=C: 1518, C≡N: 2201, C-Cl: 699.

¹H NMR (δ ppm): 2.75 (s, 3H), 3.55 (s, 2H), 7.08-7.16(d, 2H), 7.59-7.63(t, 1H), 7.81-7.85(dd, 2H), 8.04-8.08(m, 2H), 8.15-8.19(m, 2H), 8.34(s, 1H), 8.63(d, 2H).

m/z: 420.8, 386, 369, 341, 295, 247, 218, 151, 108, 92, 78.

CP3: IR (KBr, cm⁻¹): N-H: 3332, C=C: 1512, C≡N: 2198, C-Cl: 709.

¹H NMR (δ ppm): 3.66 (s, 2H), 7.18-7.22(d, 2H), 7.51-7.67(t, 1H), 7.82-7.86(dd, 2H), 8.14-8.18(m, 2H), 8.38-8.44(m, 2H), 8.51(s, 1H), 8.63(d, 2H).

m/z: 485.7 470, 451, 433, 406, 295, 218, 151, 108, 92, 78.

CP4: IR (KBr, cm⁻¹): N-H: 3318, C=C: 1524, C≡N: 2212, C-Cl: 718.

$^1\text{H NMR}$ (δ ppm): 3.41 (s, 2H), 3.59(s, 2H), 7.01-7.06(d, 2H), 7.21-7.24(t, 1H), 7.61-7.64(dd, 2H), 7.83-7.94(m, 2H), 8.17-8.25(m, 2H), 8.31(s, 1H), 8.44(d, 2H).

m/z : 421.8, 407, 387, 370, 323, 295, 247, 218, 151, 108, 92, 78.

CP5: IR (KBr, cm^{-1}): N-H: 3321, C=C: 1504, $\text{C}\equiv\text{N}$: 2208, C-Cl:695.

$^1\text{H NMR}$ (δ ppm): 3.49 (s, 2H), 7.25-7.31(d, 2H), 7.59-7.61(t, 1H), 7.69-7.72(dd, 2H), 7.88-7.94(m, 2H), 8.17-8.23(m, 2H), 8.41(s, 1H), 8.56(d, 2H).

m/z : 451.8, 437, 435, 419, 417, 400, 353, 295, 247, 218, 151, 108, 92, 78.

CP6: IR (KBr, cm^{-1}): OH: 3405, N-H: 3307, C=C: 1530, $\text{C}\equiv\text{N}$: 2226, C-Cl: 702.

$^1\text{H NMR}$ (δ ppm): 3.33(s, 2H), 4.05(s, 1H), 7.15-7.18(d, 2H), 7.59-7.61(t, 1H), 7.63-7.67(dd, 2H), 7.78-7.81(m, 2H), 8.12-8.17(m, 2H), 8.30(s, 1H), 8.39(d, 2H).

m/z : 422.8, 408, 405, 387, 371, 295, 212, 247, 218, 151, 108, 92, 78.

CP7: IR (KBr, cm^{-1}): N-H: 3319, C=C: 1522, $\text{C}\equiv\text{N}$: 2206, C-Cl: 698.

$^1\text{H NMR}$ (δ ppm): 3.21(s, 2H), 7.29-7.33(d, 2H), 7.49-7.51(t, 1H), 7.55-7.59(dd, 2H), 7.69-7.75(m, 2H), 8.20-8.25(m, 2H), 8.39(s, 1H), 8.59(d, 2H).

m/z : 441.3, 408, 406, 390, 343, 295, 247, 218, 151, 108, 92, 78.

CP8: IR (KBr, cm^{-1}): N-H: 3311, C=C: 1515, $\text{C}\equiv\text{N}$: 2221, C-Cl: 712.

$^1\text{H NMR}$ (δ ppm): 3.30(s, 2H), 7.33-7.37(d, 2H), 7.66-7.69(t, 1H), 7.75-7.80(dd, 2H), 7.77-7.83(m, 2H), 8.14-8.19(m, 2H), 8.27(s, 1H), 8.44(d, 2H).

m/z : 451.8, 438, 435, 419, 417, 353, 295, 247, 218, 151, 108, 92, 78.

CP9: IR (KBr, cm^{-1}): OH: 3410, N-H: 3321, C=C: 1526, $\text{C}\equiv\text{N}$: 2208, C-Cl: 689.

$^1\text{H NMR}$ (δ ppm): 3.32(s, 2H), 4.44(s, 1H), 7.31-7.34(d, 2H), 7.65-7.68(t, 1H), 7.71-7.75(dd, 2H), 7.81-7.86(m, 2H), 8.04-8.08(m, 2H), 8.23(s, 1H), 8.40(d, 2H).

m/z : 422.8, 408, 405, 371, 297, 213, 247, 218, 151, 108, 92, 78.

CP10: IR (KBr, cm^{-1}): N-H: 3309, C=C: 1521, $\text{C}\equiv\text{N}$: 2218, C-Cl: 701.

$^1\text{H NMR}$ (δ ppm): 3.23(s, 2H), 7.34-7.36(d, 2H), 7.60-7.63(t, 1H), 7.68-7.71(dd, 2H), 7.74-7.79(m, 2H), 8.09-8.13(m, 2H), 8.29(s, 1H), 8.39(d, 2H).

m/z : 406.8, 392, 371, 355, 308, 295, 247, 151, 108, 92, 78.

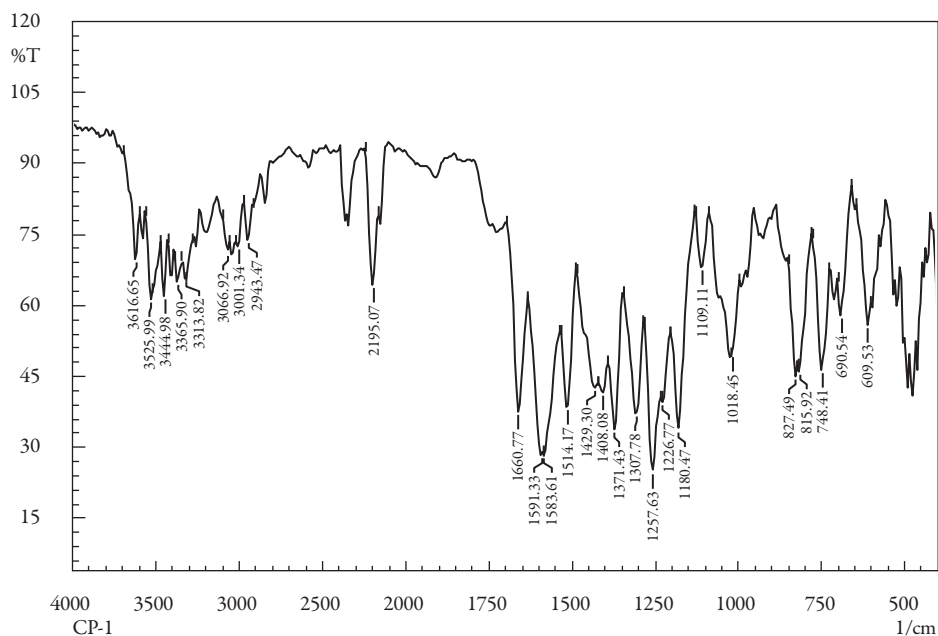
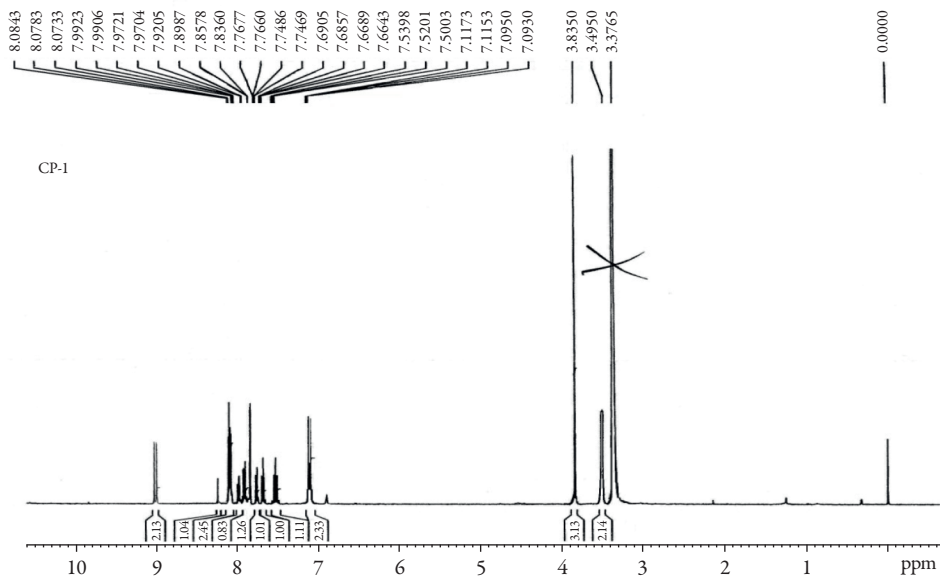


Figure 2. IR spectrum of CP-1.

Figure 3. NMR spectrum of CP-1. (*It continues*)

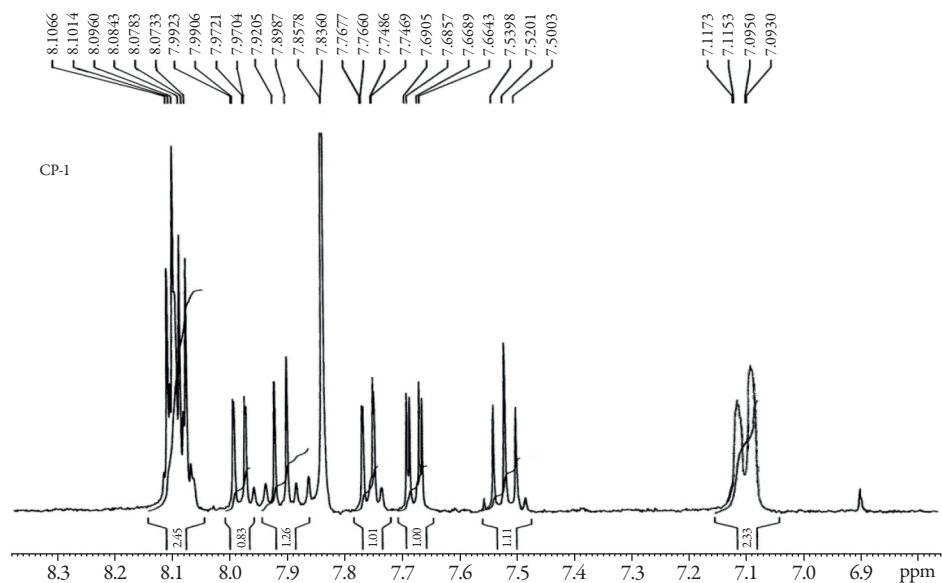


Figure 3. NMR spectrum of CP-1. (Continued)

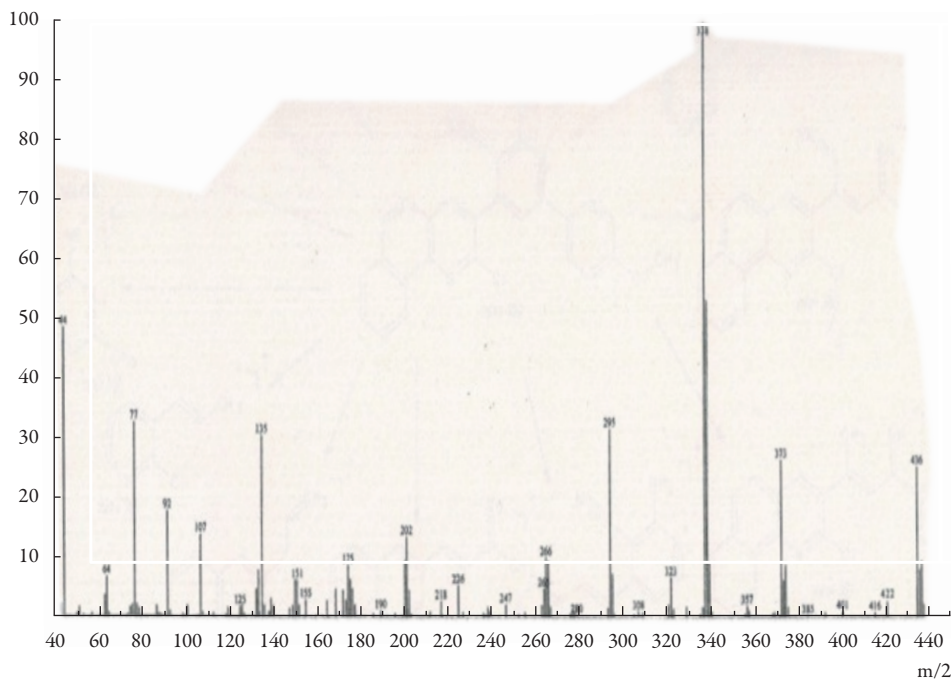


Figure 4. Mass spectrum of CP-1.

The molecular formula, molecular weight, melting point, % yield and R_f values along with the solvent systems of all the compounds are given in Table 1.

Density and Refractive index

The density of solution is related to density of pure solvent, pure solute (i.e., synthesized compound) and their weight fractions by the following equation:

$$1/\rho_{12} = g_1/\rho_1 + g_2/\rho_2$$

where ρ_1 , ρ_2 and ρ_{12} are the density of pure solvent, pure solute (i.e., synthesized compound) and solution respectively. g_1 and g_2 are the weight fractions of solvent and solute respectively. The plot of $1/g_1\rho_{12}$ versus g_1/g_2 is shown in Figure 5 for CP-1. The slope of straight line gives $1/\rho_2$.

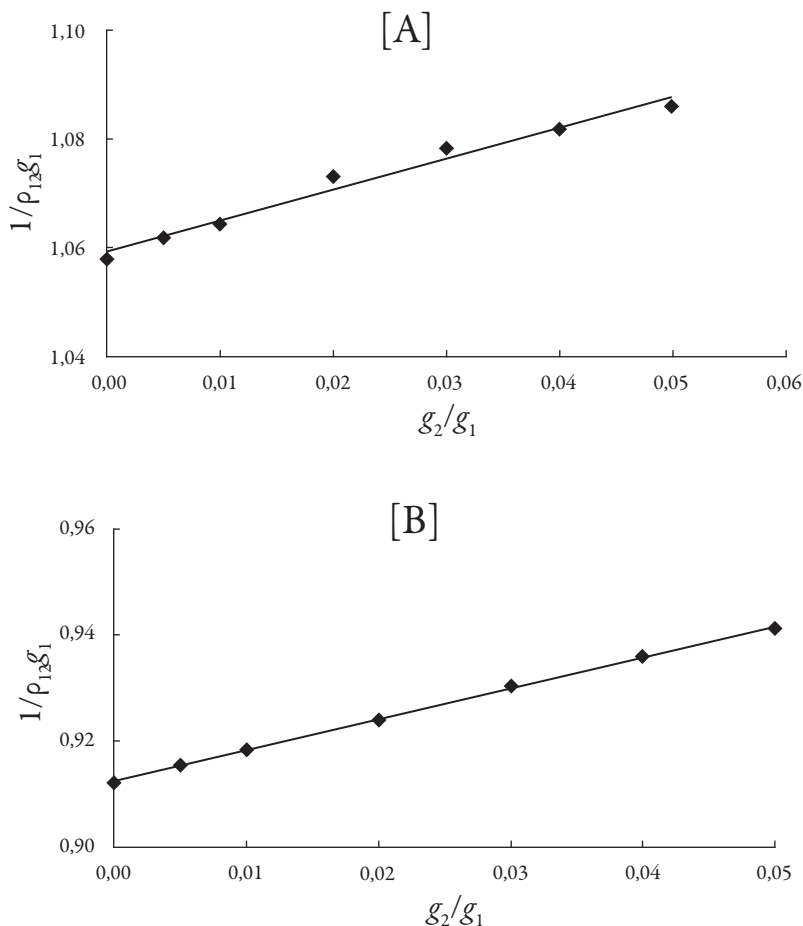


Figure 5. The plot of $(1/g_1\rho_{12})$ versus (g_1/g_2) for CP-1 in [A] DMF and [B] DMSO.

Further, the density of these compounds was also calculated using the following theoretical equation [11]:

$$\rho = KM/N_A \sum \Delta V_i$$

where ρ the density of the compound, K is packing fraction (0.599), M is the molecular weight of the compound, N_A is the Avogadro's number and ΔV_i is the volume increment of the atoms and atomic groups present in the compound. Table 2 shows the experimental and theoretical values of density. It is observed that there is deviation between experimental and theoretical density values and in different solvents, different density values are observed. This difference can be explained on the basis of interactions in solutions. In different solvents, different types of interactions exist with different solutes. This may change the volume thereby affecting the molecular weight of the compound, which ultimately affects the density. Thus, different density values in different solvents and deviation between experimental and theoretical density values suggest the presence of intermolecular interactions between solute and solvent molecules.

Table 2. Experimental and calculated densities of compounds in DMF and DMSO solutions at 298.15 K.

Compounds	Experimental Density (g/cm ³)		Theoretical Density (g/cm ³)
	DMF	DMSO	
CP-1	1.3641	1.2347	1.1673
CP-2	1.4624	1.3201	1.1517
CP-3	1.7806	1.3168	1.2990
CP-4	1.2361	1.3006	1.1928
CP-5	1.5218	1.3355	1.2354
CP-6	1.4378	1.3029	1.9530
CP-7	1.8005	1.2999	1.2162
CP-8	1.7737	1.3186	1.2350
CP-9	1.4689	1.2204	1.1884
CP-10	1.3939	1.1790	1.1665

The molar refraction of pure liquid and solutions can be determined according to Lorentz and Lorentz equations [12].

For pure liquid:

$$(MRD) = [(n^2 - 1)/(n^2 + 2)] \cdot M/\rho$$

where n , M and ρ are refractive index, molecular weight and density of pure liquid respectively.

For solutions:

$$(MRD)_{12} = [(n_{12}^2 - 1)/(n_{12}^2 + 2)] \cdot (X_1M_1 + X_2M_2)/\rho_{12}$$

where n_{12} and ρ_{12} are refractive index and density of the solution respectively. X_1 and X_2 are the mole fractions and M_1 and M_2 are the molecular weight of the solvent and solute respectively.

Using these equations, the $(MRD)_2$ and refractive index of compounds in 0.1 M solutions were calculated and are given in Table 3.

Table 3. Calculated molar refraction and refractive index of 0.1 M solution of compounds in DMF and DMSO at 298.15 K.

Compounds	Solvents			
	DMF		DMSO	
	$(MRD)_2$	n	$(MRD)_2$	n
CP-1	113.42	1.4360	145.92	1.4857
CP-2	115.88	1.4341	150.18	1.4868
CP-3	118.99	1.4361	132.03	1.4855
CP-4	142.00	1.4365	149.70	1.4864
CP-5	116.07	1.4331	134.83	1.4833
CP-6	111.32	1.4324	137.24	1.4824
CP-7	97.24	1.4322	127.63	1.4833
CP-8	104.98	1.4329	130.48	1.4831
CP-9	106.49	1.4321	135.37	1.4827
CP-10	90.99	1.4308	134.54	1.4838

Conductance

The measured conductance of all the compounds in DMF and DMSO was corrected by subtracting the conductance of pure solvent and are given in Tables 4 and 5 respectively. It is observed that conductance increases with concentration for both the solvents. Further, conductance is higher in DMF than that in DMSO.

Table 4. The measured conductance (κ) of synthesized compounds in DMF at 298.15 K.

Conc. (g/l)	$\kappa \cdot 10^5 (\Omega)^{-1}$				
	CP-1	CP-2	CP-3	CP-4	CP-5
0.000	2.40	2.40	2.40	2.40	2.40
0.001	4.00	4.10	4.40	8.50	6.90
0.002	4.30	4.30	4.90	8.80	8.10
0.004	4.80	4.50	5.40	9.30	9.20
0.006	5.30	4.90	6.00	9.80	9.90
0.008	5.90	5.60	6.80	10.50	11.20
0.010	6.80	6.30	7.60	11.40	12.80
0.020	8.30	7.00	9.90	13.70	14.60
0.040	10.80	8.50	17.50	16.70	24.90
0.060	19.60	10.30	24.00	22.50	36.00
0.080	25.00	13.30	29.90	26.70	47.40
0.100	30.00	15.50	35.30	31.50	57.90
	CP-6	CP-7	CP-8	CP-9	CP-10
0.001	5.60	6.50	8.40	5.50	4.50
0.002	5.90	6.80	8.50	5.80	5.10
0.004	6.90	7.20	8.70	6.60	5.70
0.006	7.60	8.00	9.10	7.30	6.40
0.008	9.50	9.10	9.50	8.80	7.90
0.010	10.30	10.60	11.60	9.90	8.60
0.020	14.20	15.10	12.80	13.70	11.10

(It continues)

Table 4. The measured conductance (κ) of synthesized compounds in DMF at 298.15 K.

(Continued)

Conc. (g/l)	$\kappa \cdot 10^5 (\Omega)^{-1}$				
	CP-6	CP-7	CP-8	CP-9	CP-10
0.040	18.10	28.30	27.30	17.90	21.50
0.060	21.70	31.70	35.10	21.40	29.70
0.080	27.70	38.30	46.70	27.80	36.90
0.100	35.00	44.50	53.00	35.10	43.10

Table 5. The measured conductance (κ) of synthesized compounds in DMSO at 298.15 K.

Conc. (g/l)	$\kappa \cdot 10^5 (\Omega)^{-1}$				
	CP-1	CP-2	CP-3	CP-4	CP-5
0.000	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20
0.001	2.70	2.50	2.70	3.50	5.30
0.002	2.90	3.00	3.70	3.80	5.60
0.004	3.20	3.10	4.69	4.20	6.30
0.006	3.70	3.20	4.10	4.70	7.40
0.008	4.30	3.30	5.90	5.30	9.90
0.010	5.10	4.10	6.90	5.80	11.20
0.020	7.90	5.60	8.30	6.20	13.50
0.040	9.50	7.20	9.80	7.50	15.90
0.060	11.30	8.30	12.40	9.70	17.30
0.080	13.60	9.80	14.80	11.20	19.60
0.100	16.30	12.00	17.90	13.90	21.90
	CP-6	CP-7	CP-8	CP-9	CP-10
0.001	5.30	6.30	7.60	5.10	4.30
0.002	5.50	6.60	7.90	5.40	4.90
0.004	5.90	7.20	8.40	5.90	5.70

(It continues)

Table 5. The measured conductance (κ) of synthesized compounds in DMSO at 298.15 K.
(Continued)

Conc. (g/l)	$\kappa \cdot 10^5 (\Omega)^{-1}$				
	CP-6	CP-7	CP-8	CP-9	CP-10
0.006	6.50	7.90	9.10	6.50	6.50
0.008	7.50	8.80	10.50	7.80	7.80
0.010	9.30	9.60	12.10	9.10	9.60
0.020	12.20	11.70	13.80	12.70	12.10
0.040	14.10	13.50	15.10	17.90	21.50
0.060	20.10	15.70	18.70	20.90	30.10
0.080	25.70	18.60	20.70	26.80	37.00
0.100	31.00	20.50	24.30	33.90	42.90

From these conductance values, equivalent conductance was calculated which are shown in Figures 6 and 7 for DMF and DMSO respectively. It is obvious from these figures that for all the compounds, the equivalent conductance increases uninterruptedly with decreasing concentration. However, the nature of plots suggests that the studied compounds behave as weak electrolytes in studied solvents.

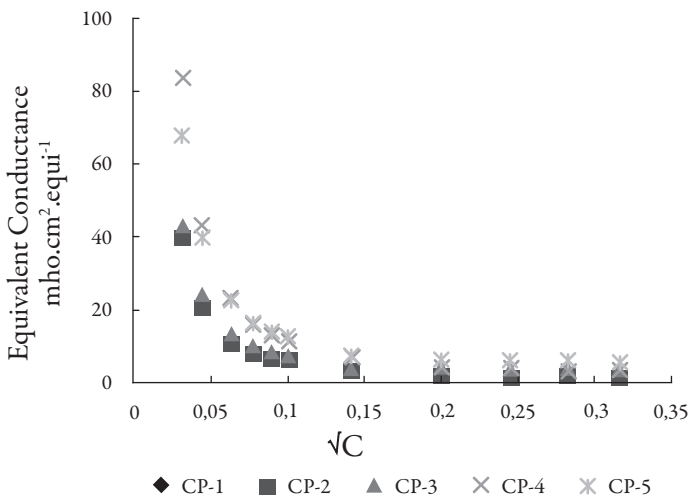


Figure 6. The equivalent conductance (λ_c) versus $\sqrt{C}$ of compounds in DMF. (It continues)

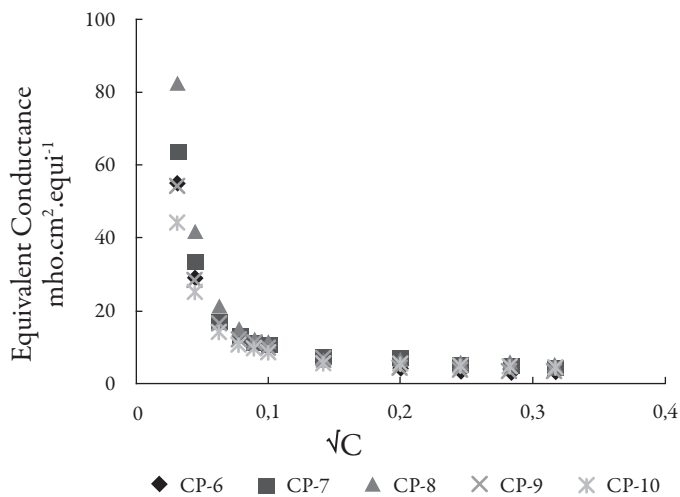


Figure 6. The equivalent conductance (λ_c) versus $\sqrt{C}$ of compounds in DMF. (Continued)

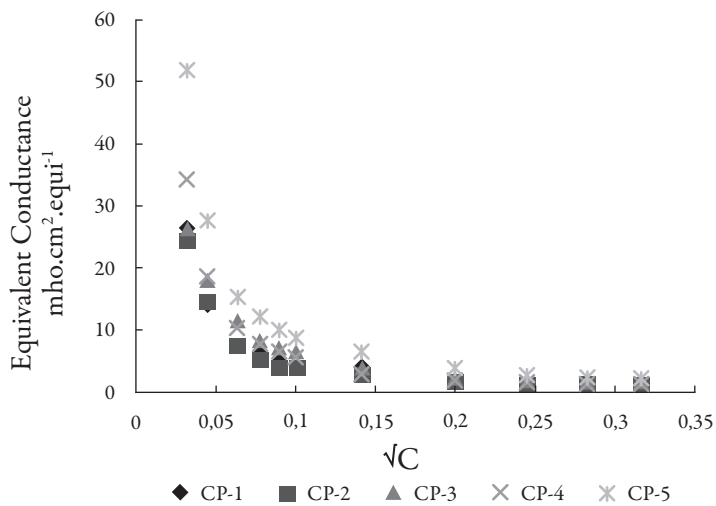


Figure 7. The equivalent conductance (λ_c) versus $\sqrt{C}$ of compounds in DMSO. (It continues)

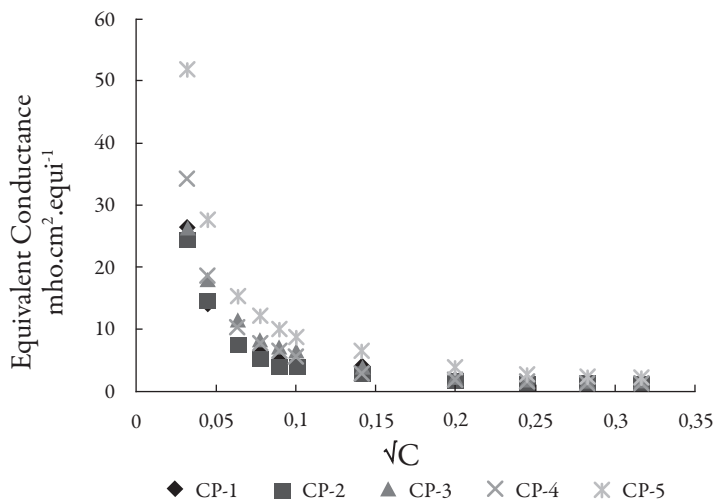


Figure 7. The equivalent conductance (λ_c) versus $\sqrt{C}$ of compounds in DMSO. (*Continued*)

CONCLUSION

The different density values in different solvents and deviation between experimental and theoretical density values suggest the presence of intermolecular interactions between solute and solvent molecules. The refractive index of 0.1 N solutions of all the derivatives is found to be different in both the solvents. The conductance increases with concentration for both the solvents for all the compounds. Further, conductance is higher in DMF than that in DMSO. In both the selected solvents, compounds behave as weak electrolytes.

ACKNOWLEDGMENT

Authors are thankful to Head of Chemistry Department, Saurashtra University, Rajkot, India for providing necessary facilities.

REFERENCES

1. X. Zou, Sh. Tu, F. Shi, J. Xu, An efficient synthesis of pyrazolo[3,4-*b*]pyridine derivatives under microwave irradiation, *ARKIVOC*, 2006(2), 130 (2006).

2. J. You, S.L. Lai, W. Liu, T.W. Ng, P. Wang, C.S. Lee, Bipolar cyano-substituted pyridine derivatives for applications in organic light-emitting devices, *J. Mater. Chem.*, **22**, 8922 (2012).
3. M.D. Bowman, M.M. Jacobson, H.E. Blackwell, Discovery of fluorescent cyano-pyridine and deazalumazine dyes using small molecule macroarrays, *Org. Lett.*, **8**(8), 1645 (2006).
4. J. Aleu, A.J. Bustillo, R. Hernández-Galán, I.G. Collado, Biocatalysis applied to the synthesis of agrochemicals, *Curr. Org. Chem.*, **10**(16), 2037 (2006).
5. Y. Mao, W. Zhu, X. Kong, Z. Wang, H. Xie, J. Ding, N.K. Terrett, J. Shen, J. Shen, Design, synthesis and biological evaluation of novel pyrimidine, 3-cyano-pyridine and *m*-amino-*N*-phenylbenzamide based monocyclic EGFR tyrosine kinase inhibitors, *Bioorg. Med. Chem.*, **21**(11), 3090 (2013).
6. M.J. Márquez, M.B. Márquez, P.G. Cataldo, S.A. Brandán, A comparative study on the structural and vibrational properties of two potential antimicrobial and anticancer cyanopyridine derivatives, *Open J. Syn. Theory Appl.*, **4**, 1 (2015).
7. P.N. Kalaria, S.P. Satasia, J.R. Avalani, D.K. Raval, Ultrasound-assisted one-pot four-component synthesis of novel 2-amino-3-cyanopyridine derivatives bearing 5-imidazopyrazole scaffold and their biological broadcast, *Eur. J. Med. Chem.*, **83**, 655 (2014).
8. V. Reddy, S.R. Gogireddy, P.K. Dubey, M. Reddy, B. Veeresh, Design, synthesis and characterization of 1 *H*-pyridin-4-yl-3,5-disubstituted indazoles and their anti-inflammatory and analgesic activity, *J. Chem. Sci.*, **127**(3), 433 (2015).
9. S.M. Sondhi, S. Jain, M. Dinodia, A. Kumar, Synthesis of some thiophene, imidazole and pyridine derivatives exhibiting good anti-inflammatory and analgesic activities, *Med. Chem.*, **4**(2), 146 (2008).
10. J.A. Riddick, W.B. Bunger, T. Sakano, "Organic solvents-physical properties and methods of purification, techniques of chemistry", 4th edition, Vol II, Wiley-Interscience Publication, John Wiley, New York, 1989.
11. G.L. Slonimskii, A.A. Askadshii, A.I. Kitaigorodskii, The packing of polymer molecules, *Vysokomol. Soyed*, **12A**, 494 (1970).
12. H.A. Lorentz, "Theory of electronics", Leipzig, 1906.

Postural hypotension associated with inappropriate choice of drug treatment of benign prostatic hyperplasia

Camilo Domínguez-Domínguez¹, Carlos Calderón-Ospina²

Escuela de Medicina y Ciencias de la Salud. Universidad del Rosario. Carrera 24 N° 63C-69. Bogotá, D. C., Colombia.

¹ Correo electrónico: camilo.dominguez@urosario.edu.co.

² Correo electrónico: carlos.calderon@urosario.edu.co.

Recibido para evaluación: 25 de abril de 2015.

Aceptado para publicación: 8 de septiembre de 2015.

SUMMARY

A case of a 76 year old Colombian patient who developed an episode of postural hypotension, after using 4mg of doxazosin for treatment of benign prostatic hypertrophy (BPH) is presented. Because of his age and severity of symptoms (asthenia, weakness, adynamia), the patient was hospitalized. Changing doxazosin by tamsulosin allowed control of symptoms of BPH with no further episodes of orthostatic hypotension.

Key words: Prostatic hyperplasia, orthostatic hypotension, adrenergic alpha-1 receptor antagonists, doxazosin, tamsulosin.

RESUMEN

Hipotensión postural asociada con una escogencia inadecuada del tratamiento medicamentoso de la hiperplasia prostática benigna

Se presenta el caso de un paciente colombiano de 76 años quien sufrió un episodio de hipotensión postural, después de tomar doxazosina de 4 mg para el manejo de la hiperplasia prostática benigna (HPB). Debido a la severidad de los síntomas (astenia, debilidad y adinamia), el paciente fue hospitalizado. El cambio de doxazosina por tamsulosina permitió el control de los síntomas de la HPB sin episodios ulteriores de hipotensión ortostática.

Palabras clave: hiperplasia prostática, hipotensión ortostática, antagonistas adrenérgicos alfa, doxazosina, tamsulosina.

BACKGROUND

Benign prostatic hypertrophy (BPH) is a relatively common problem in elderly men. Although the pharmacological management of this condition is based on the use of alpha 1-adrenergic antagonists and inhibitors of 5 alpha reductase, the appropriate choice of drug treatment is essential to avoid complications of which the most important one is postural hypotension, as it was the case with our patient, who presented postural hypotension with marked symptoms due to the use of a non-selective alpha receptor antagonist (doxazosin). This case illustrates the importance of optimal selection of drug treatment, dose adjustment and monitoring of adverse drug effects to prevent potentially serious adverse events.

CASE PRESENTATION

A 76-year-old Hispanic man presented with rapid onset asthenia, adynamia and weakness at shifting from being lying down to standing up. The patient refers these symptoms from the day before he started to take doxazosin orally 4 milligrams a day. His medical history includes chronic gastritis and benign prostatic hypertrophy recently diagnosed. Examination on admission revealed a temperature of 37 °C, heart rate of 60 beats per min, blood pressure of 104/68 mm Hg lying down; and 82/58 mm Hg standing up, respiratory rate of 16 breaths per min and oxygen saturation of 91% with pulse oximetry without supplementary oxygen. Conscious, alert, orientated, hydrated. Digital rectal exam revealed a prostate Grade III, soft and smooth consistency. Clinical examination was unremarkable. The value of serum PSA was 2.5 ng/mL. The values of urinalysis, creatinine, BUN and blood count were within normal limits. Therefore a diagnosis of orthostatic hypotension was made as an adverse drug reaction to doxazosin. The patient was hospitalized. He was checked up by the urology service that stopped doxazosin and started tamsulosin. The patient was checked up a month later, without new orthostatic hypotension episodes.

DISCUSSION

Treatment of benign prostatic hyperplasia (BPH) can be medical or surgical [1]. The pharmacological treatment options include alpha-adrenergic antagonists, 5-alpha

reductase inhibitors and some dietary supplements and natural products such as beta-sitosterol, *Pygeum africanum* and grass pollen extract *Secale cereale* sold in some countries as Cernilton® [1-3].

Regarding alpha adrenergic antagonists or alpha blockers, these reduce smooth muscle tone of the bladder neck, thereby improving the flow of urine. It is recommended that they be used in patients with moderate to severe urinary symptoms related to an International Prostate Symptom Score (I-PSS) of 8 or more, as it was the case in this patient.

In turn, there are three types of receptors called alpha-1 adrenergic 1a, 1b and 1c, the first one being predominant in the prostate, bladder neck and urethra. There are two specific drugs for alpha 1a receptors: tamsulosin and silodosin, having much lower affinity for alpha 1b and alpha 1c receptors, responsible for maintaining vascular tone induced by adrenergic ligands [1]. Non-selective receptor alpha blockers include doxazosin, terazosin, prazosin, alfuzosin and indoramin. Because they are non-selective molecules, they generate significant vasodilation; therefore they are preferred in the treatment of benign prostatic hyperplasia accompanied by hypertension, or even they are indicated as monotherapy in the treatment of hypertension as second line drugs [1, 2].

However, its use in non-hypertensive patients like this, with PBH as only condition, can lead to severe postural hypotension as an adverse reaction to the drug, putting them on an increased risk of dizziness, syncope and falls, another morbidity and even mortality [4].

Precisely, in order to determine the potential of vasodilation caused by tamsulosin and subsequent hypotension compared to alpha 1 adrenergic not selective antagonists, a comparative study was carried out in 10 healthy volunteers previously treated with phenylephrine, a potent vasoconstrictor that acts as an alpha 1 receptors agonist. The results were conclusive to prove that terazosin reversed the vasoconstriction induced by phenylephrine, while tamsulosin virtually lacked of the effects on physiological parameters indicative of this phenomenon (blood flow and arterial pressure values) [5].

In fact, three alpha 1-adrenergic non-selective antagonists (doxazosin, prazosin, terazosin) have the black box warning issued by the FDA of severe hypotension and syncope, especially after the first dose, as was the case in our patient [6].

However, it is noteworthy that the use of tamsulosin also carries a risk of generating low blood pressure, although this is lower than that generated by non-selective alpha-adrenergic antagonists. In this way a cohort study conducted in US patients, it was found that the incidence of severe hypotension (requiring hospital admission) with tamsulosin was extremely low (42.4 events per 10,000 person years) [6]. Also it was estimated that the risk of severe hypotension is higher in the first 8 weeks of treatment [6].

This is also the case for silodosin. The manufacturer establish that it can produce orthostatic hypotension, dizziness, or syncope [7]. Silodosin has a few drug interactions, for example with metabolic inducers and inhibitors like calcium channel antagonists, macrolides and antifungal agents (e.g., ketoconazole) because it is a substrate of Uridine Diphosphate-glucuronosyltransferase (UGT) 2B7 [7].

In this vein, a systematic review that included 26 randomized trials of alpha-1 adrenergic antagonists for the treatment of BPH found that vascular adverse events defined as dizziness, syncope or hypotension had the following comparative OR: 3.71 (95% CI 2.48 - 5.53) with terazosin, 3.32 (95% CI 2.1 - 5.23) with doxazosin, 1.66 (95% CI 1.17 - 2.36) with alfuzosin and 1.42 (95% CI 0.99 - 2.05) with tamsulosin (8). Thus, there is first level evidence regarding tamsulosin is safer than non - selective alpha-1 receptor antagonists, as regards the possibility of generating vascular adverse events [8].

In conclusion, it is considered that two medication errors could happened in this patient; the first regarding with the selection of the drug for BPH treatment, and secondly for not taken care to warn the patient about a possible first-dose hypotension, which in fact occurred, and was severe enough to warrant admission to the hospital.

Causality assessment

Regarding causality assessment we used the Naranjo algorithm [9] and World Health Organization – Uppsala Monitoring Centre (WHO-UMC) scale [10], with the following results:

Naranjo's Algorithm:

1. Are there previous conclusive reports on this reaction?
Yes +1
2. Did adverse event appear after the suspected drug was given?
Yes +2
3. Did the adverse reaction improve when the drug was discontinued or a specific antagonist was given?
Yes 0
4. Did the adverse reaction appear when the drug was readministered?
Not known or not done 0
5. Are there alternative causes that could have caused the reaction?
No +2

6. Did the reaction reappear when a placebo was given?

Not known or not done 0

7. Was the drug detected in any body fluid in toxic concentrations?

Not known or not done 0

8. Was the reaction more severe when the dose was increased, or less severe when the dose was decreased?

Not known or not done 0

9. Did the patient have a similar reaction to the same or similar drugs in any previous exposure?

Not known or not done 0

10. Was the adverse event confirmed by any objective evidence?

Yes +1

Score: 6, Probable adverse drug reaction

WHO-UMC: Probable/Likely Event or laboratory test abnormality, with reasonable time relationship to drug intake. Unlikely to be attributed to disease or other drugs. Response to withdrawal clinically reasonable. Rechallenge not required.

The case was reported to the Pharmacovigilance Committee of the institution, and reported to the National Pharmacovigilance Program at INVIMA.

LEARNING POINTS

- To consider tamsulosin or silodosin before than a non-specific $\alpha 1$ -adrenergic blocking agent, in the initial pharmacological management of benign prostatic hypertrophy.
- Start doxazosin, 1 mg/daily in eligible patients for the drug.
- To recognize the postural hypotension as a frequent adverse effect from $\alpha 1$ -adrenergic blocking agents, especially in elderly patients.
- To warn patients about this adverse reaction and to explain them the alarm signs of this condition.

REFERENCES

1. T.J. Wilt, J. N'Dow. Benign prostatic hyperplasia. Part 2 – management, *BMJ*, 336, 7637 (2008).

2. M. Oelke, A. Bachmann, A. Descazeaud, M. Emberton, S. Gravas, M.C. Michel, J. N'Dow, I. Nordling, J.J. de la Rosette, European Association of Urology. EAU guidelines on the treatment and follow-up of non-neurogenic male lower urinary tract symptoms including benign prostatic obstruction, *Eur. Urol.*, **64**, 2 (2013).
3. T.H. Kim, H.J. Lim, M.S. Kim, M.S. Lee, Dietary supplements for benign prostatic hyperplasia: An overview of systematic reviews, *Maturitas*, **73**, 3 (2012).
4. S.R. Fine, P. Ginsberg, Alpha-adrenergic receptor antagonists in older patients with benign prostatic hyperplasia: Issues and potential complications, *J. Am. Osteopath. Assoc.*, **108**, 7 (2008).
5. K. Harada, M. Ohmori, A. Fujimura, Comparison of the antagonistic activity of tamsulosin and doxazosin at vascular alpha1-adrenergic receptors in humans, *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, **354**, 5 (1996).
6. S.T. Bird, J.A. Delaney, J.M. Brophy, M. Etminan, S.C. Skeldon, A.G. Hartzema, Tamsulosin treatment for benign prostatic hyperplasia and risk of severe hypotension in men aged 40-85 years in the United States: Risk window analyses using between and within patient methodology, *BMJ*, **347** (2013).
7. Watson Pharma. Rapaflo® (silodosin) capsules prescribing information. Corona, CA, 2008, Oct.
8. J.C. Nickel, S. Sander, T.D. Moon, A meta-analysis of the vascular-related safety profile and efficacy of alpha-adrenergic blockers for symptoms related to benign prostatic hyperplasia, *Int. J. Clin. Pract.*, **62**, 10 (2008).
9. C.A. Naranjo, U. Busto, E.M. Sellars, P. Sandor, I. Ruiz, E.A. Roberts *et al.*, A method for estimating the probability of adverse drug reactions, *Clin. Pharmacol. Ther.*, **30**, 239 (1981).
10. The World Health Organization – Uppsala Monitoring Centre. The use of the WHO-UMC system or standardised case causality assessment. Available from: <http://who-umc.org/Graphics/24734.pdf>. Last access: September 4th 2015.

Análisis comparativo de la cinética de liberación de diclofenaco sódico a partir de matrices hidrofílicas en medios de disolución convencionales y biorrelevantes

Plinio A. Sandoval¹, Ali Rajabi-Siahboomi², Luisa Fernanda Ponce D'León³

¹ Colorcon Colombia, Cr. 129 No. 22B-57, interior 13, Bogotá, Colombia. Correo electrónico: psandoval@colorcon.com.

² Colorcon Inc., Global Headquarters, 275 Ruth Road, Harleysville, PA 19438, USA. Correo electrónico: asiahboomi@colorcon.com.

³ Universidad Nacional de Colombia, Departamento de Farmacia, Bogotá, Colombia. Correo electrónico: lfponced@unal.edu.co.

Recibido para evaluación: 5 de noviembre de 2014.

Aceptado para publicación: 22 de septiembre de 2015.

RESUMEN

Se utilizaron dos polímeros hidrofílicos comúnmente empleados en la formulación de matrices de liberación extendida, hidroxipropil-metil-celulosa (HPMC, hipromelosa) y óxido de polietileno (PEO), junto con celulosa microcristalina y lactosa, con el objetivo de estudiar la cinética de liberación del diclofenaco sódico en los aparatos II y III de la USP, en un medio de disolución compendial y en medios biorrelevantes. La cinética de liberación predominante en el aparato II fue uno y en el aparato III, cero. El valor de las constantes n y k aplicando la ley del exponente, indicaron tanto para el aparato II como para el III, que no se presenta el efecto “burst” y que el mecanismo predominante en la liberación del fármaco, es la relajación y la erosión del polímero. Los resultados sugieren que la metodología de disolución en un medio biorrelevante es apropiada para discriminar entre formulaciones y para predecir el desempeño *in vivo* de tabletas de liberación extendida de diclofenaco sódico.

Palabras clave: diclofenaco, Methocel, Polyox, cinética, medios biorrelevantes.

SUMMARY

A comparative analysis of the release kinetics of sodium diclofenac from hydrophilic matrices in conventional dissolution media and biorelevant media is carried out

Two hydrophilic polymers commonly employed on the development of extended release products, hydroxypropyl-methyl-cellulose (HPMC, hypromellose) and polyethylene oxide (PEO) were formulated with microcrystalline cellulose or lactose in order to investigate the release kinetics of sodium diclofenac on USP apparatus II and III using a compendial or biorelevant media, respectively. The dominant release kinetic on apparatus II was first order and zero on apparatus III. The values of the kinetic constant (k) and the release exponent (n) from the Power Law Model indicated that there was no burst effect in none of the studied formulations, relaxation and polymer erosion was the dominant mechanism of drug release in both methods. The results suggest that biorelevant dissolution methodology is appropriate for the discrimination of formulations and prediction of *in vivo* performance of MR diclofenac sodium matrices.

Key words: Diclofenac, Methocel, Polyox, kinetics, biorelevant media.

INTRODUCCIÓN

El diclofenaco sódico es un antiinflamatorio no esteroideo, que posee efecto antiinflamatorio y analgésico. Este fármaco de clase II del sistema de clasificación biofarmacéutico, presenta un valor de pK_a de 4,2 y un coeficiente de reparto $\log P$ (n -octanol/agua) de 13,4, lo que indica que es afín por las membranas lipídicas [1]. La vida media biológica es de 1 a 2 horas, lo que indica que por sí solo este fármaco no tiene un efecto de acción sostenida. Esto justifica el desarrollo de una tableta de liberación extendida de este fármaco, en donde se reduce la dosificación de dos o tres tomas diarias a una sola, así como la incidencia y la gravedad de los efectos secundarios y adversos.

El producto de referencia del mercado es el Voltaren-XR®, comercializado por Novartis. La composición cualitativa del producto señala que corresponde a una matriz lipídica, no hinchable ni erosionable, en la cual, el agente formador de matriz es el alcohol cetílico [2, 3]. Las matrices lipídicas son elaboradas mediante el método de fusión

adicionando el fármaco y otros diluentes solubles o insolubles sobre ceras o grasas fundidas, donde se mezclan en constante agitación. Posteriormente, toman lugar procesos de enfriamiento y granulación en el caso de la elaboración de *pellets* o compresión en el caso de compactos [4]. El método de fusión no es muy común en la industria farmacéutica, lo cual puede representar un obstáculo para la selección de las matrices lipídicas como un sistema de entrega de liberación prolongada. Por el contrario, los métodos tradicionales para la obtención de comprimidos como la compresión directa o la granulación (húmeda o seca), han demostrado ser adecuados para la manufactura de matrices hidrofílicas. Los fenómenos que gobiernan la liberación del fármaco a partir de matrices lipídicas corresponden a i) difusión del fármaco a lo largo de poros llenos de medio de disolución y ii) erosión interna o superficial, mediante el proceso de digestión [5, 6].

Las matrices hidrofílicas, en particular las conformadas con hipromelosa u óxido de polietileno, son las formas farmacéuticas de liberación prolongada más empleadas cuando se busca alcanzar un perfil de liberación extendido [7]. En la literatura se reportan ampliamente los métodos para el estudio de la liberación y el tipo de cinética a partir de dichas matrices, empleando los aparatos I o II de la United States Pharmacopeia (USP), y estos son rutinariamente empleados en las actividades de desarrollo de productos [8, 9]. En la mayoría de los casos, los medios de disolución empleados corresponden a soluciones *buffer*, en donde se ajusta la fuerza iónica y el tipo de especies en solución. Sin embargo, los estudios señalan que para los fármacos de clase II (Sistema de Clasificación Biofarmacéutico, BSC, por sus siglas en inglés), los medios de disolución compendiales (USP) no ofrecen un grado de predicción confiable de la disolución *in vivo*, al ser comparados con medios que simulan la realidad biológica, o también conocidos como medios de disolución biorrelevantes [10]. La composición de cada medio de disolución biorrelevante en términos de su fuerza iónica, pH, concentración de sales biliares y lecitina, es tal que provee propiedades fisicoquímicas similares a las del contenido de los fluidos fisiológicos en cada punto del tracto gastrointestinal. El proceso de reabsorción de las sales biliares que se realiza en el íleon, se considera a partir del medio de disolución que representa el íleon superior; de esta forma, la concentración de sales biliares se ajusta a la mitad en este medio y luego se reduce a cero en los medios de disolución posteriores [11]. La ventaja de los medios de disolución biorrelevantes es que permiten predecir el desempeño *in vivo* de la liberación del IFA (ingrediente farmacéutico activo) a partir de la forma farmacéutica, debido a que el factor limitante para la absorción de los IFA de clase II del BSC, el cual es la disolución, puede ser modelado *in vitro* [12]. De esta forma, los medios de disolución biorrelevantes pueden ser aplicados para predecir diferencias en biodisponibilidad entre formulaciones, en la fase de desarrollo [12, 13].

El aparato III de la Farmacopea de Estados Unidos (USP, por sus siglas en inglés) (cilindro reciprocante) acoplado a los medios de disolución biorrelevantes, ofrece un método de disolución diseñado desde un punto de vista fisiológico. Su aplicación permite establecer la liberación del fármaco, sometiendo la forma farmacéutica a una serie de medios de disolución que representan fluidos biológicos. El tiempo de exposición del producto a cada medio, se puede ajustar a tiempos que representan el tránsito en el tracto gastrointestinal. Además, el diseño del equipo permite cambiar el tipo de malla superior e inferior y la velocidad de inmersión del cilindro que contiene la forma farmacéutica, modificando así la hidrodinamia a la que se somete el producto; lo que finalmente conduce a la posibilidad de establecer un pronóstico *in vitro* del posible efecto del peristaltismo *in vivo* [11, 14, 15]. Varias publicaciones demuestran cómo el empleo de los medios de disolución biorrelevantes, permite predecir el efecto de la presencia de alimentos en la biodisponibilidad; de esta manera, su utilización en conjunto con el aparato III, permite optimizar y acelerar el proceso de preformulación y formulación de un sistema de liberación extendida [16-18].

El tracto gastrointestinal en el estado de ayuno, se caracteriza por tener un pH bajo en el estómago ($\sim 1,8$) y un valor de pH mayor en el duodeno (~ 6) y en el yeyuno ($\sim 6,5 - 6,8$). Los tiempos de tránsito en el estado de ayuno en voluntarios sanos, dependen del complejo motor migratorio intestinal [11, 16].

Por el contrario, en el estado alimentado, los tiempos de residencia en el estómago son más prolongados, y los valores de pH se modifican, siendo más elevado en el estómago (~ 4) y más bajos en el duodeno (~ 5) y en el yeyuno ($\sim 5,5$ a $6,5$). El vaciado gástrico y los tiempos de residencia en el estado alimentado, también son afectados por el tipo de alimentos presentes (contenido graso y de carbohidratos), la presión osmótica y el pH [11, 16, 18].

En el presente estudio, se planteó como objetivo principal: i) identificar los fenómenos involucrados en la liberación del IFA (difusión o erosión) y ii) comparar cuantitativamente la cinética de liberación del diclofenaco sódico (DS) a partir de matrices hidrofílicas de Methocel™ y Polyox™ (hidroxipropil-metil-celulosa y óxido de polietileno, respectivamente) en los diferentes medios seleccionados. Para ello se emplearon el aparato II y un medio de disolución compendial junto con un método de disolución diseñado fisiológicamente (aparato III acoplado a los medios de disolución biorrelevantes). La hipótesis planteada es que la cesión del activo permite establecer una cinética de primer orden para el proceso de lio-disposición, en las matrices elaboradas con HPMC (hidroxipropil-metil-celulosa o hipromelosa) y de orden cero para las estructuradas con óxido de polietileno (PEO, por sus siglas en inglés), debido a la marcada diferencia entre las velocidades de hidratación de los dos polímeros.

METODOLOGÍA

Materias primas: hidroxipropil-metil-celulosa, HPMC (Methocel K4M Premium CR, Colorcon), óxido de polietileno (PEO) (Polyox WSR 303), lactosa monohidrato (DMV Fonterra Excipients), lactosa Spray-Dried (NF Lactose-316 FastFlo, Sheffield Pharmaingredients), celulosa microcristalina de 50 μm y 90 μm (Microcel 101 y Microcel 102, Blanver), hidroxipropil-metil-celulosa (Methocel E5LV Premium, Colorcon), dióxido de silicio coloidal (Cab-O-Sil, Cabot GmbH), talco (USP) y estearato de magnesio (USP), sistema de recubrimiento entérico (Acryl-EZE®, Colorcon). Methocel™ y Polyox™ son marcas registradas de “The Dow Chemical Company”.

Reactivos analíticos: para los ensayos de disolución en el aparato II se emplearon 900 mL de *buffer* de fosfatos USP 0,05 M, pH 7,5 y en el aparato III se emplearon: taurocolato sódico, lecitina, NaOH en *pellets*, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, NaCl, ácido acético glacial y agua destilada.

Equipos: tableteadora tipo rotativa, marca Talleres Sánchez, granulador de lecho fluidizado NR Industries FBS-1, spectrophotometer Hewlett Packard 8452 con arreglo de diodos, equipo de disolución Hanson SR-8-PLUS-8S-P (aparato II), aparato de cilindros recíprocos (aparato III, USP), automuestreador acoplado al aparato III (Logan Instruments Disso III) y equipo para cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC, por sus siglas en inglés) (Alliance 2695, Waters Corp., Milford, MA).

Elaboración de las tabletas con recubrimiento entérico: el diclofenaco sódico y alguno de los dos diluentes seleccionados (lactosa o celulosa microcristalina) se mezclaron en una proporción 100:45 en un mezclador Hobart por 5 minutos. Posteriormente, esta mezcla se granuló mediante la técnica de granulación húmeda por lecho fluido, con una solución al 6% (p/p) de HPMC de bajo peso molecular (Methocel E5LV Premium). La tabla 1 muestra los parámetros estandarizados empleados en la granulación.

Tabla 1. Condiciones de granulación empleadas para las combinaciones diclofenaco sódico - diluyente.

Combinación	Temperatura aire entrada (°C)	Velocidad de adición del aglutinante (g/min)
Diclofenaco S. - Lactosa	50	25
Diclofenaco S. - Celulosa M.	70	15

Nota: en los dos casos, la presión de atomización se mantuvo constante en 2,75 bares.

El granulado resultante, una vez estandarizado, se mezcló por 10 minutos con el polímero formador de matriz seleccionado (Methocel K4M Premium CR o Polyox WSR 303) y con el aerosil en un mezclador Hobart por 10 minutos. El talco y el estearato de magnesio se pasaron por una malla 60, se adicionaron a la mezcla anterior y se mezclaron por 3 minutos más. La mezcla final se comprimió en una tableteadora rotativa (Talleres Sánchez), empleando un diámetro de punzón de 9 mm. Las tablas 2 y 3 muestran la composición de las matrices evaluadas.

Tabla 2. Composición de las matrices evaluadas combinando el agente formador de matriz Methocel K4M Premium CR con los dos diluentes seleccionados.

Función	Ingredientes	Composición (porcentaje p/p)									
		F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8	F9	F5
Ingrediente activo	Diclofenaco sódico	33,3	33,3	33,3	33,3	33,3	33,3	33,3	33,3	33,3	33,3
Agente formador de matriz	Methocel K4M Premium CR	0,0	15,0	30,0	45,0	60,0	0,0	15,0	30,0	45,0	60,0
Diluyente	Lactosa	60,0	45,0	30,0	15,0	0,0					
	Celulosa microcristalina						60,0	45,0	30,0	15,0	0,0
Aglutinante	Methocel E5LV Premium	3,6	3,6	3,6	3,6	3,6	3,6	3,6	3,6	3,6	3,6
Deslizante	Dióxido de silicio coloidal	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Antiadherente	Talco	1,3	1,3	1,3	1,3	1,3	1,3	1,3	1,3	1,3	1,3
Lubricante	Estearato de magnesio	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8
Total		100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0

Tabla 3. Composición de las matrices evaluadas combinando el agente formador de matriz Polyox WSR 303 con los dos diluentes seleccionados.

Función	Ingredientes	Composición (porcentaje p/p)									
		F1	F12	F13	F14	F15	F6	F17	F18	F19	F15
Ingrediente activo	Diclofenaco sódico	33,3	33,3	33,3	33,3	33,3	33,3	33,3	33,3	33,3	33,3
Agente formador de matriz	Polyox WSR 303	0,0	15,0	30,0	45,0	60,0	0,0	15,0	30,0	45,0	60,0
Diluyente	Lactosa	60,0	45,0	30,0	15,0	0,0					
	Celulosa microcristalina						60,0	45,0	30,0	15,0	0,0
Aglutinante	Methocel E5LV Premium	3,6	3,6	3,6	3,6	3,6	3,6	3,6	3,6	3,6	3,6
Deslizante	Dióxido de silicio coloidal	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Antiadherente	Talco	1,3	1,3	1,3	1,3	1,3	1,3	1,3	1,3	1,3	1,3
Lubricante	Estearato de magnesio	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8
Total		100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0

En todos los casos, el peso teórico de la tableta fue de 300 mg y el contenido de diclofenaco sódico de 100 mg. Las cinco formulaciones evaluadas corresponden a variaciones de la proporción: diluyente-polímero formador de matriz, donde en todos los casos la suma total es 60% de la composición. Las matrices hidrofílicas se sometieron a un proceso de recubrimiento con película, en un equipo de recubrimiento marca O'Hara Labcoat con un producto comercial (Acryl-EZE, Colorcon), el que incluye en su composición al copolímero del ácido metacrílico tipo C, USP 34-NF 29. Las condiciones de recubrimiento empleadas se presentan en la tabla 4. La cantidad de recubrimiento

entérico con el que se recubrieron las tabletas correspondió a un incremento en peso del 10% de su peso inicial, logrando un peso final teórico medio de 330 mg.

Tabla 4. Condiciones promedio de recubrimiento empleadas en el recubrimiento de las matrices hidrofílicas.

Parámetro	O'Hara, Labcoat I
Carga de tabletas (kg)	0,3
Temperatura de las tabletas (°C)	32
Volumen de aire de entrada (CFM)	60
Temperatura del aire de entrada (°C)	57-59
Temperatura del aire de salida (°C)	35-36
Velocidad de aplicación (g/min)	8,8
Presión de atomización (psi)	15
Presión del patrón de atomización (psi)	20
Velocidad del bombo (rpm)	18
Distancia de la pistola a las tabletas (cm)	12
Número de pistolas	1

Evaluación del proceso de disposición del diclofenaco sódico empleando el aparato II

Para realizar la determinación del proceso de lio-disposición del diclofenaco sódico, se empleó el aparato II a 100 rpm con "sinkers", en un medio de disolución de *buffer* de fosfatos 0,05 M ajustado a un pH de 7,5. La evolución de la cantidad disuelta en función del tiempo, se siguió por espectrofotometría a una longitud de onda de 276 nm mediante la aplicación de una metodología analítica validada.

Evaluación del proceso de disposición del diclofenaco sódico empleando el aparato III y medios de disolución biorrelevantes

La evaluación de la liberación del diclofenaco sódico en el aparato III, empleó un equipo marca Logan Instruments Disso III con cilindros reciprocantes. La velocidad de inmersión para todas las pruebas fue de 5 inmersiones por minuto y la longitud de desplazamiento del cilindro fue de 10 cm. Los tiempos de residencia *in vitro* en cada medio, representan los tiempos de tránsito gastrointestinal caracterizados y reportados

en la literatura. La composición de cada medio en términos de su fuerza iónica, pH, concentración de sales biliares y lecitina, se ajustaron de tal forma, que proveen propiedades fisicoquímicas similares a las del contenido de los fluidos fisiológicos en cada punto del tracto gastrointestinal. El proceso de reabsorción de las sales biliares que se realiza en el íleon, se consideró a partir del medio de disolución que representa el íleon superior; de esta forma, la concentración de sales biliares se ajustó a la mitad y luego se eliminaron las sales biliares en los dos medios de disolución posteriores (BlankFaSSIF y BlankFeSSIF) [11]. La suspensión de nutrientes Ensure Plus® se empleó directamente sin ajustes de pH, con el fin de evitar la coagulación de los componentes. Las muestras de Ensure Plus® se sometieron a dilución, se centrifugaron y filtraron previo a la cuantificación del activo. Los muestreos se tomaron en tiempos preestablecidos, reportados en la tabla 5 y la cuantificación se realizó siguiendo la metodología de cromatografía líquida de alta eficiencia descrita en la monografía de tabletas de liberación extendida de diclofenaco sódico de la USP 32 [19].

La tabla 5 muestra los pH de los diferentes medios empleados y los tiempos de residencia para las pruebas de disolución.

Tabla 5. Medios de disolución biorrelevantes: pH y tiempos de residencia.

Sección del tracto gastrointestinal	Estado de ayuno			Estado alimentado		
	Medio de disolución	pH	Tiempo de residencia (min)	Medio de disolución	pH	Tiempo de residencia (min)
Estómago	FaSSGF	1,8	60	Ensure Plus	6,4	1w20
Yeyuno superior	FaSSIF	6,5	15	FeSSIF	5,0	45
Yeyuno inferior	FaSSIF	6,8	15	FeSSIF	6,5	45
Íleon superior	FaSSIF	7,2	30	FeSSIF	6,5	45
Íleon inferior	BlankFaSSIF	7,5	120	BlankFeSSIF	7,5	45
Colon proximal	BlankFaSSIF	6,5	720	BlankFeSSIF	6,5	840
FaSSGF	Fasted State Simulated Gastric Fluid			Fluido gástrico que simula la condición de ayuno		
FaSSIF	Fasted State Simulated Intestine Fluid			Fluido intestinal que simula el estado de ayuno		

(Continúa)

Tabla 5. Medios de disolución biorrelevantes: pH y tiempos de residencia.
(Continuación)

Sección del tracto gastrointestinal	Estado de ayuno			Estado alimentado		
	Medio de disolución	pH	Tiempo de residencia (min)	Medio de disolución	pH	Tiempo de residencia (min)
FeSSIF	Fed State Simulated Intestine Fluid			Fluido intestinal que simula el estado alimentado		
Blank	Indica un reajuste de la concentración de las sales biliares a la mitad de la concentración inicial					
Tiempos de muestreo de las pruebas del estado de ayuno: 60, 75, 90, 120, 240, 360, 480, 600, 720, 840 y 960 minutos						
Tiempos de muestreo de las pruebas del estado alimentado: 120, 165, 210, 255, 300, 420, 540, 660, 780, 900, 1020 minutos						

La preparación de los medios de disolución siguió las recomendaciones encontradas en la literatura y adoptadas por la USP (11, 14). La tabla 6 muestra la composición general de los medios de disolución biorrelevantes.

Tabla 6. Composición general de los medios de disolución biorrelevantes (11).

Componente	Unidades	FaSSIF	FeSSIF
Taurocolato de sodio	mM	3,0	15,0
Lecitina	mM	0,75	3,75
NaOH (<i>pellets</i>)	g	0,174	4,04
NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	g	1,977	-
NaCl	g	3,093	11,874
Agua purificada	mL	csp 500	csp 1.000
Ácido acético glacial	g	-	8,65
<i>pH</i>		6,5	5,0
<i>Osmolaridad</i>	mOsmol/kg	270	670

Nota: el ajuste al pH requerido se hace con soluciones 1N de HCl o NaOH.

Los muestreos se tomaron en tiempos preestablecidos y la cuantificación se realizó por un método HPLC estandarizado (Alliance 2695, Waters Corporation, Milford, MA).

Evaluación de la cinética de liberación

A partir de los datos de la concentración de diclofenaco sódico disuelto en cada intervalo de muestreo, se calculó el porcentaje disuelto acumulado en función del tiempo. Mediante el análisis gráfico de los resultados, se calculó para cada réplica: el orden cinético más probable y el modelo matemático que describe el comportamiento del proceso, del que se obtiene la constante de velocidad específica de disposición. El análisis gráfico buscó, además, detectar y cuantificar posibles tiempos de latencia, alteraciones de la velocidad e incluso establecer probables cambios cinéticos ocurridos durante el proceso de disposición del diclofenaco sódico. También se emplearon los modelos de Korsmeyer-Peppas, ecuación (1) [20] para el análisis de los datos en el aparato II y el modelo modificado por Ford y cols., ecuación (2) [21] para los del aparato III, con objeto de identificar los fenómenos involucrados en el proceso de liberación y para comparar el desempeño de las diferentes formulaciones de matrices. El modelo modificado propuesto por Ford y cols., se aplicó con el fin de hacer el ajuste del tiempo, debido a la presencia del “lagtime” inicial. Las ecuaciones (1) y (2) se presentan a continuación:

$$\frac{M_t}{M_\infty} = Kt^n \quad (1)$$

$$\frac{M_t}{M_\infty} = k(t-l)^n \quad (2)$$

Donde: M_t/M_∞ es la fracción de fármaco liberado, k es la constante de difusión, n es el exponente asociado al mecanismo de liberación y t es el tiempo y l , en el caso de la ecuación (2), es el “lagtime”.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Evaluación de las formulaciones de las tabletas de diclofenaco sódico

La granulación en húmedo del DS, permitió comunicarle características plásticas al granulado y evitar los inconvenientes encontrados cuando se intentó la compresión directa. La tabla 7 muestra las características farmacotécnicas de los granulados preparados; en los dos casos se obtuvieron granulados con una voluminosidad y densidad adecuadas [22].

Tabla 7. Características farmacotécnicas de los granulados obtenidos mediante la técnica de lecho fluido para las combinaciones de diclofenaco sódico (DS) y lactosa monohidrato (LM) o celulosa microcristalina (MCC), expresadas como el promedio y coeficiente de variación (CV).

Granulado	Densidad global (g/mL)	Densidad apisonada (g/mL)	Voluminosidad (mL/g)	Índice de Hausner	Índice de Carr	Índice de fluidez (mm)	Vel. flujo (disco 7 mm) (g/s)	Ángulo reposo (grados)
DS – MCC	0,31 ± [0,29]	0,42 ± [0,75]	3,20	1,34	26	5	1,72± [0,31]	34,52 ± [2,12]
DS – LM	0,36 ± [0,33]	0,45 ± [0,41]	2,74	1,22	18	5	4,97± [1,72]	28,85 ± [1,34]

Las tablas 8 y 9 muestran las características de las tabletas preparadas de acuerdo con la composición indicada en las tablas 2 y 3. Como se aprecia, las tabletas preparadas con materiales recomendados para compresión directa, presentaron un aspecto más uniforme, superficie lisa, con excelentes propiedades mecánicas y variación de peso baja.

Tabla 8. Características mecánicas de las matrices hidrofílicas obtenidas para las formulaciones que contienen Methocel K4M CR (promedio ± CV).

		Methocel K4M Premium CR - Lactosa monohidrato					Methocel K4M Premium CR - Celulosa microcristalina				
		F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8	F9	F5
Peso promedio	(mg)	301,8 ± 0,2	300,7 ± 0,5	302,1 ± 0,6	300,9 ± 0,7	302,4 ± 0,5	302,3 ± 0,6	300,2 ± 0,4	300,4 ± 0,7	300,5 ± 0,6	302,4 ± 0,5
Dureza	(kg-f)	10,6 ± 3,6	11,4 ± 7,4	12,6 ± 9,4	11,2 ± 7,6	12,5 ± 6,1	12,2 ± 5,5	12,7 ± 4,1	12,2 ± 5,0	12,2 ± 8,4	12,5 ± 6,1
Friabilidad	(%)	0,29 ± 15,1	0,30 ± 14,6	0,32 ± 17,3	0,30 ± 16,0	0,29 ± 8,3	0,19 ± 12,8	0,29 ± 10,7	0,28 ± 17,2	0,28 ± 7,7	0,27 ± 13,9
Diámetro	(mm)	9,22 ± 0,28	9,22 ± 0,28	9,23 ± 0,29	9,22 ± 0,28	9,22 ± 0,26	9,22 ± 0,38	9,22 ± 0,28	9,23 ± 0,29	9,22 ± 0,26	9,22 ± 0,26
Altura	(mm)	4,33 ± 0,78	4,34 ± 0,90	4,36 ± 0,75	4,34 ± 0,65	4,40 ± 0,84	4,40 ± 1,00	4,39 ± 0,55	4,39 ± 0,55	4,39 ± 0,51	4,40 ± 0,84

Tabla 9. Características mecánicas de las matrices hidrofílicas obtenidas para las formulaciones que contienen Polyox WSR 303 (promedio $\pm$ CV).

		Polyox WSR 303 - Lactosa monohidrato					Polyox WSR 303 - Celulosa microcristalina				
		F1	F12	F13	F14	F15	F6	F17	F18	F19	F15
Peso promedio	(mg)	301,8 $\pm$ 0,2	302,1 $\pm$ 1,3	302,8 $\pm$ 0,9	301,8 $\pm$ 0,4	301,6 $\pm$ 1,3	302,3 $\pm$ 0,6	301,6 $\pm$ 0,4	300,8 $\pm$ 0,5	301,8 $\pm$ 0,4	301,6 $\pm$ 1,3
Dureza	(kg-f)	10,6 $\pm$ 3,6	12,9 $\pm$ 7,8	13,2 $\pm$ 2,5	12,8 $\pm$ 3,2	12,7 $\pm$ 7,1	12,2 $\pm$ 5,5	12,4 $\pm$ 7,8	12,3 $\pm$ 5,6	12,7 $\pm$ 5,1	12,7 $\pm$ 7,1
Friabilidad	(%)	0,29 $\pm$ 15,1	0,28 $\pm$ 10,6	0,26 $\pm$ 15,9	0,26 $\pm$ 16,3	0,29 $\pm$ 16,7	0,19 $\pm$ 12,8	0,30 $\pm$ 14,31	0,28 $\pm$ 17,8	0,28 $\pm$ 19,8	0,30 $\pm$ 18,4
Diámetro	(mm)	9,22 $\pm$ 0,28	9,22 $\pm$ 0,28	9,23 $\pm$ 0,29	9,22 $\pm$ 0,26	9,23 $\pm$ 0,46	9,22 $\pm$ 0,38	9,20 $\pm$ 0,40	9,21 $\pm$ 0,56	9,21 $\pm$ 0,43	9,23 $\pm$ 0,46
Altura	(mm)	4,33 $\pm$ 0,78	4,36 $\pm$ 0,92	4,35 $\pm$ 0,67	4,36 $\pm$ 0,92	4,42 $\pm$ 0,93	4,40 $\pm$ 1,00	4,41 $\pm$ 0,48	4,40 $\pm$ 0,84	4,40 $\pm$ 0,76	4,42 $\pm$ 0,93

Efecto de la composición de la matriz hidrofílica en la cinética de liodisposición del diclofenaco sódico empleando el aparato II

Las gráficas de la figura 1 muestran los perfiles de liberación para las 16 formulaciones de matrices, en el aparato II, $n = 3$ (100 rpm con “sinters”, *buffer* de fosfatos 0,05 M ajustado, pH de 7,5).

La tabla 10 resume el análisis de la cinética del proceso de liberación en el aparato II. Se observó desintegración de las tabletas, solo cuando el porcentaje presente del diluyente fue del 100%, independiente del diluyente (F1 y F6). Predominantemente, la cinética de liberación fue de primer orden. En todos los casos, la liberación del fármaco fue más lenta al incrementarse la proporción del polímero formador de matriz. La magnitud del valor de la constante k , para el caso del método de Korsmeyer-Peppas, indicó en términos generales, que no se presentó en ningún caso un efecto “burst” marcado, considerando que los valores de la constante k , son inferiores a 0,3 en todos los casos y que diversas publicaciones sugieren que estos valores son bajos [23, 24]. Para el total de las formulaciones evaluadas, el valor de la constante n estuvo en alrededor de 1,0, confirmando que los fenómenos que controlan la liberación son la relajación del polímero y la erosión (o disolución) del polímero [21, 25].

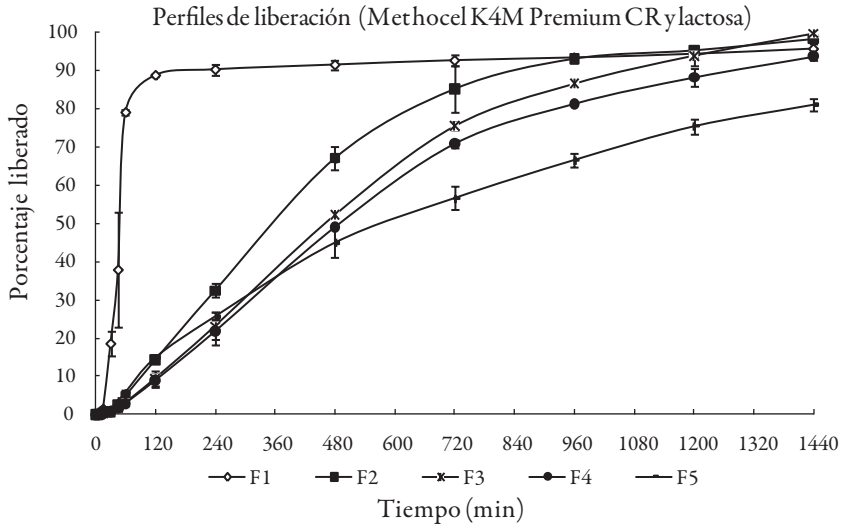


Figura a.

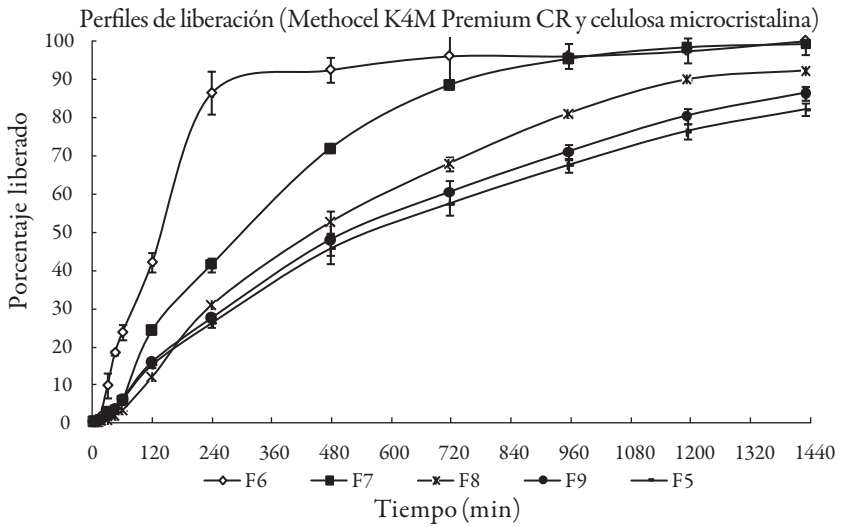


Figura b.

Figura 1. Perfiles de liberación para las 16 formulaciones bajo estudio, aparato II, $n = 3$ (100 rpm con “sinters”, *buffer* de fosfatos 0,05 M ajustado, pH de 7,5).

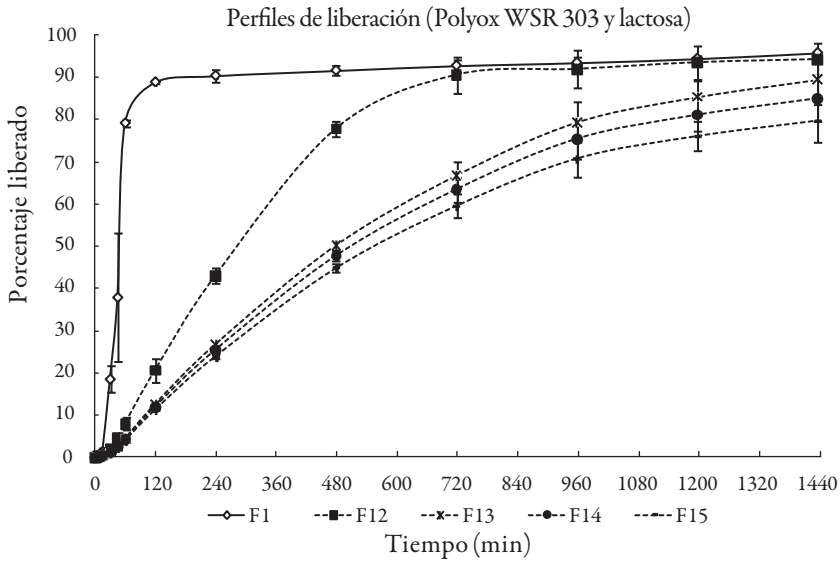


Figura c.

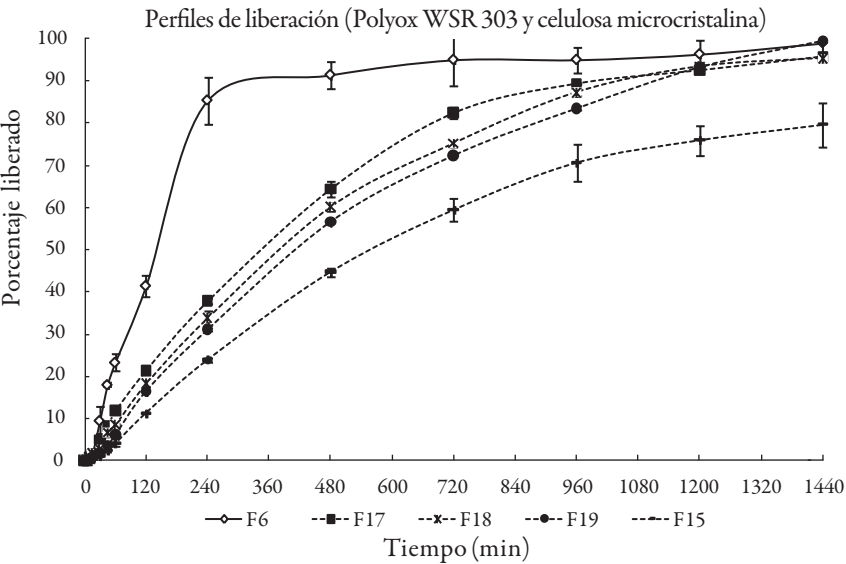


Figura d.

Figura 1. Perfiles de liberación para las 16 formulaciones bajo estudio, aparato II, $n = 3$ (100 rpm con “sinters”, *buffer* de fosfatos 0,05 M ajustado, pH de 7,5).

Efecto de la composición de la matriz hidrofílica en la cinética de liodisposición del diclofenaco sódico, empleando el aparato III acoplado a medios biorrelevantes

Las gráficas de la figura 2, muestran los perfiles de liberación logrados en las ocho formulaciones estudiadas. Se seleccionaron las formulaciones en las que el contenido de polímero formador de matriz fuera del 15% o del 45% con el objetivo de estudiar los fenómenos que controlaban la liberación en los extremos de contenido bajo y alto del polímero, en presencia del diluyente.

Para el caso de las formulaciones F2 y F4 donde el diluyente es la lactosa, se observó la desintegración de las tabletas en el caso de la formulación F2, presumiblemente debido a la baja proporción de Methocel (15%), independiente del diluyente, y de las condiciones del medio (estado de ayuno o alimentado). La formulación F4 no se desintegró en ninguno de los medios de disolución gracias a un mayor contenido de polímero formador de matriz Methocel (45%).

Para las formulaciones F7 y F9 donde el diluyente es la celulosa microcristalina, la formulación F7 (Methocel al 15%) se erosionó de manera pronunciada en el medio que simula el estado de ayuno, sin presentar desintegración; sin embargo, hubo desintegración en el medio que simula el estado alimentado. La formulación F9 (Methocel al 45%) no presentó erosión superficial en el medio que simula el estado de ayuno; no obstante, se desintegró completamente en el medio que simula el estado alimentado.

En el caso de la formulación F9, a pesar de tener el contenido más alto de Methocel, se observa que la presencia de la celulosa (excipiente, prácticamente insoluble, pero hidrofílico) interfiere con la formación del gel. Aunque la celulosa facilita la entrada del agua por capilaridad, al no disolverse en ella la deja libre, y, a su vez, al rodear como una especie de malla a las partículas del Methocel en proceso de hidratación, interfiere en la coalescencia de las mismas, paso fundamental para estructurar el gel. Lo anteriormente descrito, explica esencialmente la desintegración de la tableta. Cabe resaltar que las tabletas de la formulación F4 (Methocel al 45% y lactosa al 15%) no se desintegraron en el medio que simula el medio alimentado, por lo que presumiblemente la lactosa no interfiere con la formación de la capa gel.

Aunque la evaluación de la cesión del diclofenaco sódico en el aparato II no pudo detectar la desintegración en las formulaciones anteriores, el método de disolución fisiológicamente diseñado (aparato III acoplado a los medios biorrelevantes) sugiere que para las tabletas de liberación prolongada con los IFA como el diclofenaco sódico, preferiblemente se debe evitar en la formulación de matrices hidrofílicas, porcentajes de Methocel bajos, y en combinación con celulosa microcristalina.

Tabla 10. Resultados del análisis gráfico y del modelo Korsmeyer-Peppas [20] en el aparato II.

Formulación	Análisis gráfico				Ley del exponente (Korsmeyer-Peppas)				
	Orden cinético	Ecuación	Rango de tiempo (min)	R ²	k	n	R ²	Rango de validez	Observaciones
F1	Cero	y = -1,682x + 128,79	15 a 60	0,9507	-	-	-	-	TD
F2	Uno	y = 113,85e(-0,003x)	10-1.440	0,9938	0,015	1,385	0,9834	45 a 480	
F3	Cero	y = -0,109x + 102,53	10-720	0,9980	0,011	1,366	0,9895	45 a 720	
F4	Cero	y = -0,104x + 103,22	45 a 720	0,9985	0,015	1,295	0,9843	45 a 960	
F5	Uno	y = 100,30e(-0,001x)	0 a 1.440	0,9992	0,140	0,913	0,9765	45 a 1.200	
F6	Cero	y = -0,364x + 101,46	10 a 240	0,9948	-	-	-	-	TD
F7	Uno	y = 110,00e(-0,003x)	15 a 1.440	0,9962	0,027	1,319	0,9607	30 a 480	
F8	Uno	y = 105,11e(-0,002x)	0 a 1.440	0,9954	0,011	1,370	0,9586	45 a 720	
F9	Uno	y = 101,27e(-0,001x)	0 a 1.440	0,9989	0,147	0,913	0,9765	45 a 1.200	
F12	Uno	y = 111,02e(-0,003x)	10 a 720	0,9936	0,061	1,180	0,9849	45 a 480	
F13	Uno	y = 103,50e(-0,002x)	0 a 1.440	0,9984	0,038	1,163	0,9816	45 a 720	
F14	Uno	y = 101,88e(-0,001x)	0 a 1.440	0,9971	0,036	1,163	0,9816	45 a 720	
F15	Uno	y = 100,73e(-0,001x)	0 a 1.440	0,9942	0,044	1,104	0,9787	45 a 960	
F17	Uno	y = 101,36e(-0,002x)	0 a 1.440	0,9976	0,288	0,877	0,9900	30 a 720	
F18	Uno	y = 104,93e(-0,002x)	0 a 1.440	0,9962	0,261	0,866	0,9906	45 a 960	
F19	Uno	y = 104,16e(-0,002x)	5 a 960	0,9982	0,092	1,024	0,9723	45 a 960	

Nota: TD indica que se presentó desintegración de las tabletas y un proceso de disolución muy rápido.
El valor del coeficiente de determinación se calculó para las 16 formulaciones, en el rango de tiempo correspondiente a la fracción liberada entre 5% a 80%.

El análisis gráfico señaló que el orden cinético predominante fue cero en todas las formulaciones, excepto en la F7. Los resultados de la ley del exponente en el aparato III, confirman que en ningún caso hay un efecto “burst” significativo ($k \leq 0,3$) y que en todos los eventos, los fenómenos que controlan la liberación del diclofenaco sódico, fueron la relajación y la erosión del polímero ($n \sim 1,0$). Estos valores de k y n indican que para las formulaciones que no se desintegraron, hay una velocidad de formación del gel lo suficientemente rápida, como para controlar el ingreso masivo de agua al interior de la tableta.

Para el caso del Polyox, ninguna de las formulaciones se desintegró, independiente del tipo de diluyente utilizado o de la composición del medio (ayuno frente a alimentado). En todos los casos, el orden cinético obtenido por análisis gráfico fue cero, y para el análisis por medio de la ley del exponente, todos los valores de k fueron inferiores a 0,3 y los de $n \sim 1,0$; ello indica que el Polyox actúa sobre la liberación por un proceso de relajación y erosión.

Por otra parte, se puede establecer una correlación entre las velocidades de hidratación de los polímeros (siendo considerablemente más rápida la de Polyox comparada con la de Methocel) [26] y las formulaciones en las que no se presentó desintegración de las tabletas. En todos los casos en los que está presente el Polyox, incluso a porcentajes bajos, ninguna formulación se desintegró; mientras que para el Methocel, las que contenían porcentajes bajos del polímero se desintegraron.

En términos generales, al incrementarse la proporción del polímero, la liberación del diclofenaco sódico se hace más lenta.

Las tablas 11 y 12 resumen los resultados del análisis gráfico de la cinética del proceso de liberación de las ocho formulaciones en el aparato III.

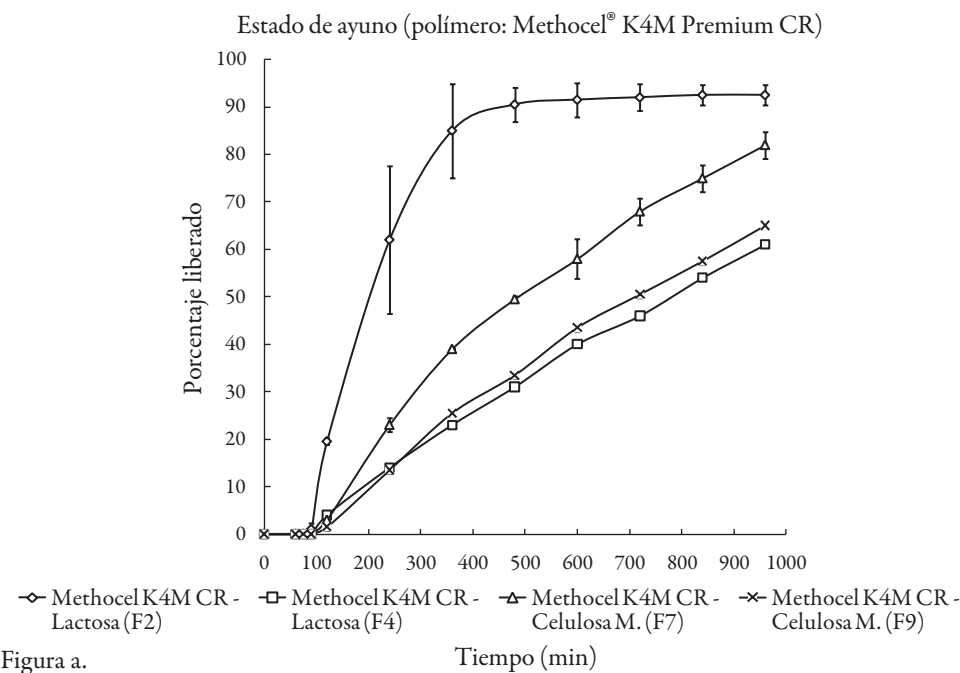


Figura a.

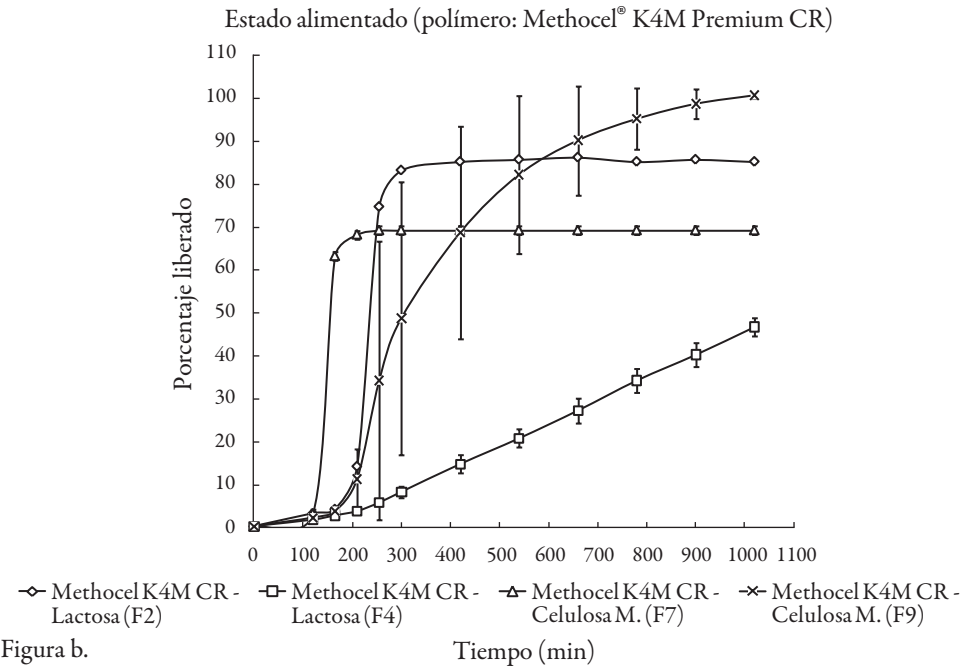


Figura b.

Figura 2. Perfiles de liberación para las formulaciones F2, F4, F7, F9, F12, F14, F17 y F19, en el aparato III y medios biorrelevantes en el estado de ayuno y alimentado, $n = 2$.

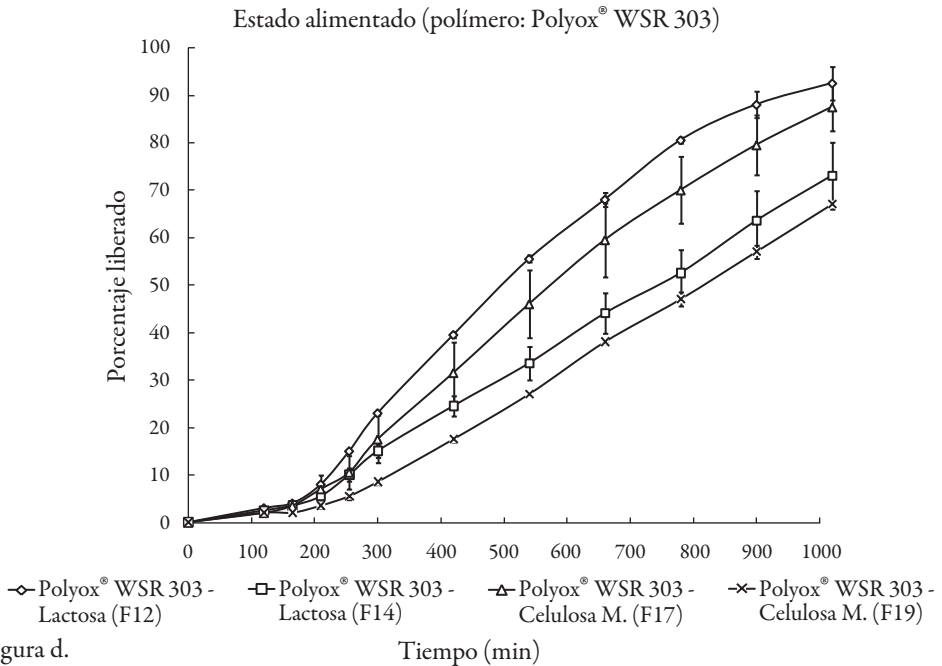
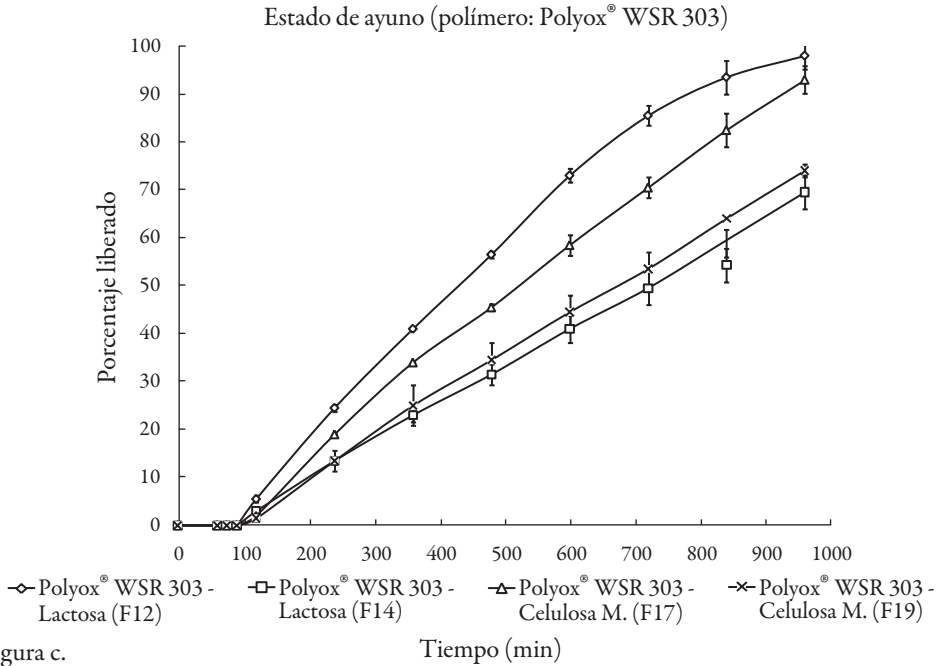


Figura 2. Perfiles de liberación para las formulaciones F2, F4, F7, F9, F12, F14, F17 y F19, en el aparato III y medios biorrelevantes en el estado de ayuno y alimentado, $n = 2$.

Tabla 11. Resultados del análisis de la cinética mediante el método gráfico y del modelo modificado de Korsmeyer-Peppas [21] en el aparato III para las matrices a base de Methocel K4M CR.

Estado de ayuno									
Análisis gráfico					Ley del exponente modificada (Korsmeyer-Peppas)				
Formulación	Orden cinético	Ecuación	Rango de validez (min)	R ²	k	n	R ²	Rango de validez	Observaciones
F2	-	-	-	-	-	-	-	-	TD
F4	Cero	$y = 0,0692x - 3,5508$	90 a 960	0,9944	0,084	0,98	0,9969	120 a 960	
F7	Uno	$y = 119 e^{-0,0018x}$	90 a 960	0,9932	0,172	0,94	0,9827	120 a 840	
F9	Cero	$y = 0,076x - 4,869$	90 a 960	0,9904	0,128	0,93	0,9967	120 a 960	
Estado alimentado									
F2	-	-	-	-	-	-	-	-	TD
F4	Cero	$y = 0,052x - 6,7219$	120 a 1.020	0,9998	0,041	1,04	0,9997	255 a 1.020	
F7	-	-	-	-	-	-	-	-	TD
F9	-	-	-	-	-	-	-	-	TD

Nota: TD indica que se presentó desintegración de las tabletas y un proceso de disolución rápido.

Tabla 12. Resultados del análisis de la cinética mediante el método gráfico y del modelo Korsmeyer-Peppas en el aparato III para las matrices a base de Polyox WSR 303.

Estado de ayuno									
Análisis gráfico					Ley del exponente (Korsmeyer-Peppas)				
Formulación	Orden cinético	Ecuación	Rango de validez (min)	R ²	k	n	R ²	Rango de validez	Observaciones
F12	Cero	y = 0,1365x - 10,04	90 a 720	0,9965	0,138	1,01	0,9983	120 a 600	
F14	Cero	y = 0,078x - 6,179	90 a 960	0,9993	0,085	0,99	0,9991	120 a 960	
F17	Cero	y = 0,1081x - 7,989	90 a 960	0,9960	0,127	0,99	0,9962	120 a 840	
F19	Cero	y = 0,085x - 7,242	90 a 960	0,9988	0,104	0,98	0,9988	120 a 960	
Estado alimentado									
F12	Cero	y = 0,125x - 15,164	120 a 780	0,9936	0,138	0,98	0,9848	210 a 1.020	
F14	Cero	y = 0,081x - 9,607	120 a 1.200	0,9991	0,162	0,90	0,9990	210 a 1.020	
F17	Cero	y = 0,108x - 14,823	165 a 900	0,9944	0,127	0,99	0,9955	210 a 780	
F19	Cero	y = 0,078x - 13,693	165 a 1.200	0,9967	0,061	1,04	0,9994	255 a 1.020	

Nota: TD indica que se presentó desintegración de las tabletas.

Efecto de la composición del medio (estado de ayuno frente a alimentado) en la cinética de liodisposición del diclofenaco sódico, empleando el aparato III

Las gráficas de la figura 3, muestran los perfiles de liberación en función de la composición del medio de disolución para las ocho formulaciones seleccionadas. Para las formulaciones donde no se presentó desintegración en alguno de los medios (F4, F12, F14, F17 y F19), se observa un retraso de la liberación del fármaco en los perfiles de liberación en el estado alimentado, ocasionado por las condiciones de la prueba durante la estadía de las matrices en las dos primeras celdas:

- i) Celda 1: Ensure Plus® pH: 6,4 - tiempo de tránsito de 120 minutos, y
- ii) Celda 2: FeSSIF pH: 5,0 - tiempo de tránsito de 45 minutos.

Sin embargo, no se observó un cambio significativo en el valor de los valores k (velocidad de erosión), para la mayoría de las formulaciones evaluadas, tanto en el medio que simula el estado de ayuno, como el alimentado. Esto sugiere que la velocidad de erosión es muy similar, en función de la hidrodinámica aplicada (cinco inmersiones por minuto), y que se vio afectada por la concentración del polímero.

El retraso observado en la liberación en el medio que simula el estado alimentado, se debió presumiblemente a:

- La exposición inicial de las matrices al Ensure Plus® durante 2 horas, en donde, debido a la mayor viscosidad de este medio de disolución, posiblemente se presentó una lenta hidratación y disolución de la película entérica o una velocidad de erosión considerablemente menor [11], y
- A que durante el lapso posterior de 45 minutos en el medio que simula el estado alimentado del yeyuno superior (celda 2), en el que las matrices se expusieron a un pH de 5,0, el fármaco estuvo expuesto a un pH donde se ve reducida su solubilidad. Sin embargo, una vez las matrices fueron transferidas a la celda 3, donde el pH es 6,5, se ve un incremento en la cantidad liberada.

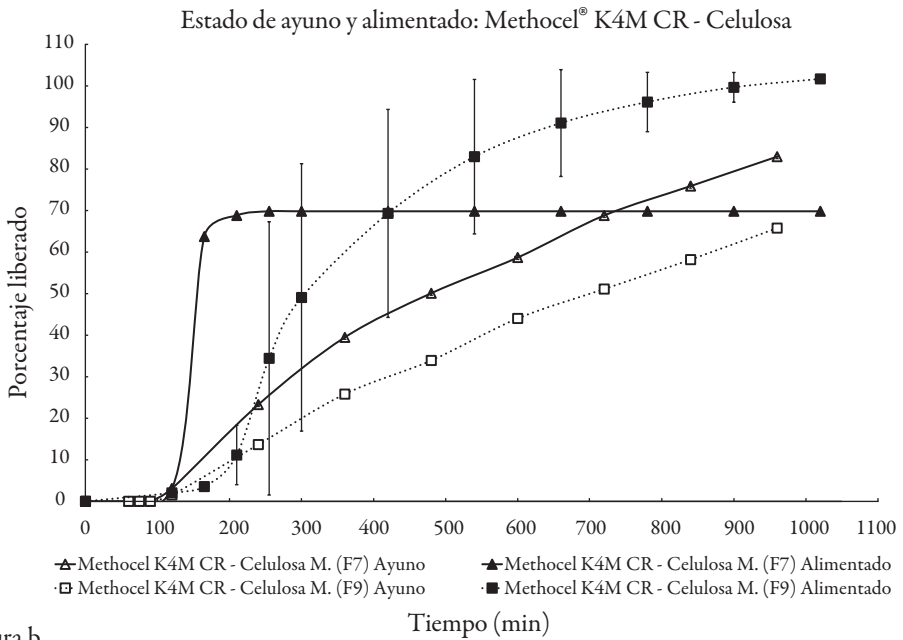
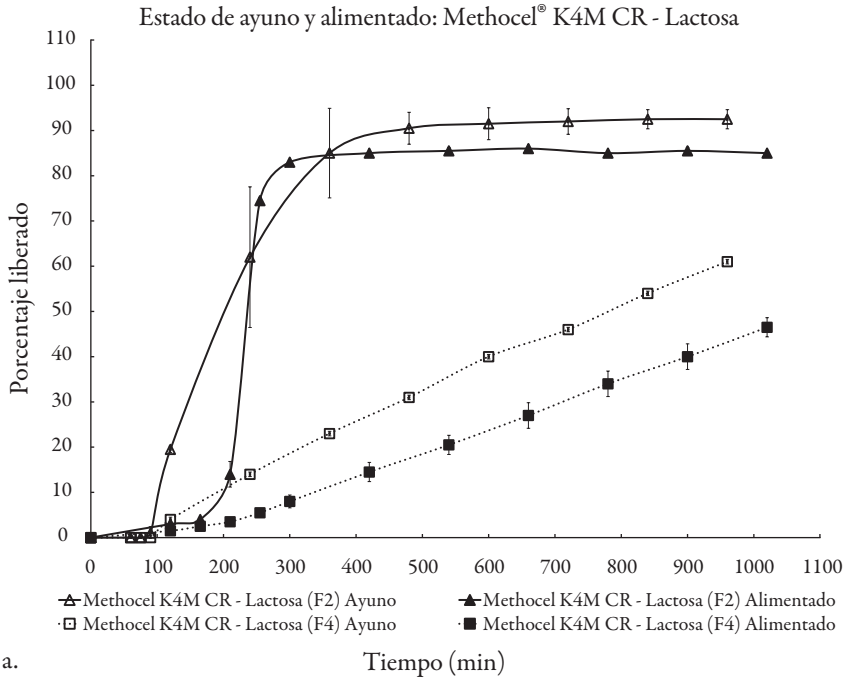


Figura 3. Perfiles de liberación para las formulaciones F2, F4, F7, F9, F12, F14, F17 y F19, en el aparato III y medios biorrelevantes en el estado de ayuno y alimentado, $n = 2$.

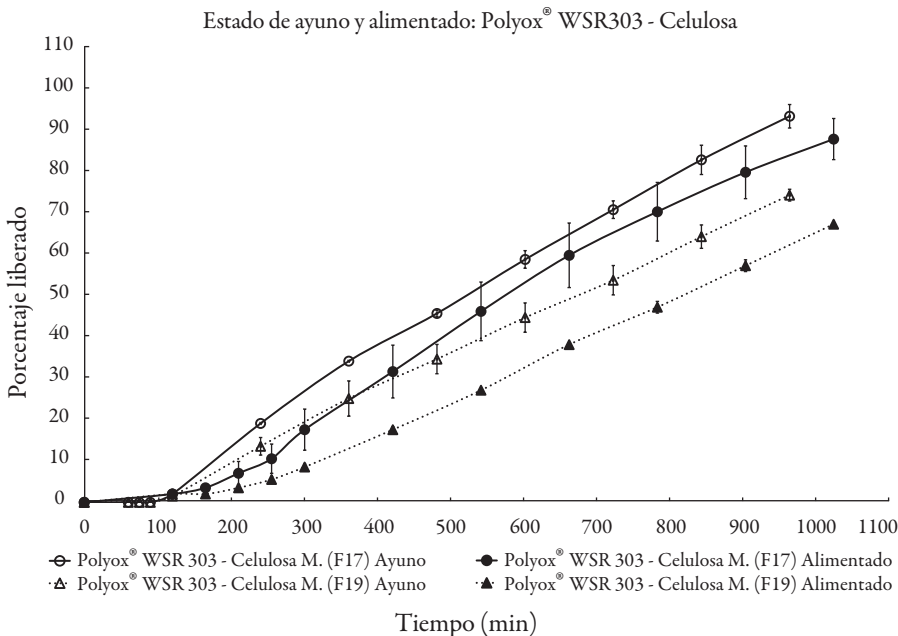
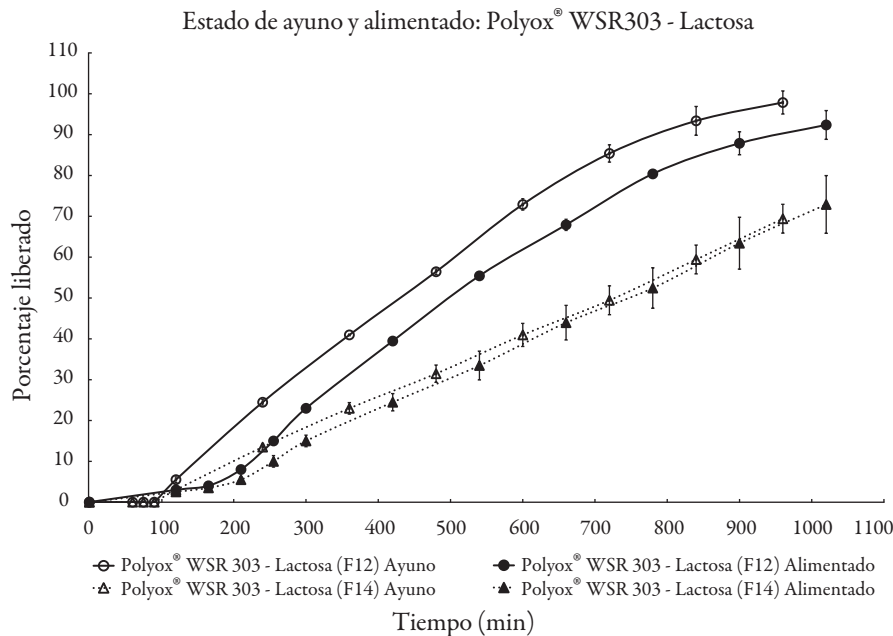


Figura 3. Perfiles de liberación para las formulaciones F2, F4, F7, F9, F12, F14, F17 y F19, en el aparato III y medios biorrelevantes en el estado de ayuno y alimentado, $n = 2$.

CONCLUSIONES

Se logró demostrar que la utilización de los medios de disolución biorrelevantes acoplados con el equipo III de la USP, constituyen una herramienta que permite discriminar entre formulaciones, con objeto de hacer un pronóstico del desempeño *in vivo* de productos de liberación extendida.

El método de disolución diseñado desde un punto de vista fisiológico, logró detectar la erosión pronunciada de las matrices de Methocel™, en las que el porcentaje del polímero fue del 15%, independiente del diluyente lactosa / celulosa microcristalina.

Para la formulación F9, la que contenía Methocel™ en 45% en combinación con la celulosa microcristalina, se observó la desintegración completa de las matrices en el medio de disolución que simula el estado alimentado, por lo que se recomienda emplear como diluyente la lactosa.

Para el caso de las formulaciones que contenían Polyox™, ninguna de las formulaciones se desintegró, independientemente del tipo de diluyente utilizado o de la composición del medio (ayuno frente a alimentado), lo que posiblemente se atribuye a la mayor velocidad de hidratación de este polímero, en comparación con la del Methocel™.

Se encontró que el Polyox™ WSR 303, presentó un mayor grado de robustez frente a las diferentes condiciones evaluadas, presumiblemente gracias a su mayor velocidad de hidratación, exhibiendo cinéticas muy convenientes para este caso, de orden cero.

AGRADECIMIENTOS

Por la colaboración prestada para el desarrollo de la tesis de Maestría de uno de los autores (P.A. Sandoval, Ref. [22]) manifestamos nuestros agradecimientos a las siguientes instituciones y estudiantes:

- A la Dirección de Investigación de la sede Bogotá, de la Universidad Nacional de Colombia, por el apoyo económico que hizo posible adelantar el presente estudio, y a los estudiantes del Programa de Farmacia de la misma universidad que participaron en las actividades investigativas de los estudios de granulación y disolución del presente estudio.
- A los departamentos analíticos y de desarrollo de nuevos productos de la casa matriz de Colorcon en los Estados Unidos, por el apoyo ofrecido al permitirnos realizar la determinación de los perfiles de disolución en el aparato III acoplado a los medios biorrelevantes (Colorcon Global Headquarters, Colorcon, Inc. 275 Ruth Road, Harleysville, PA 19438).

REFERENCIAS

1. M.E. Palomo, M.P. Ballesteros, P. Frutos, Analysis of diclofenac sodium and derivatives, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **21**(1), 83-94 (1999).
2. Novartis Pharmaceuticals Corporation (febrero 2011), Voltaren®-XR. Prescribing information. URL: http://www.pharma.us.novartis.com/product/pi/pdf/voltaren_xr.pdf, consultado el 18 de septiembre de 2015.
3. E. Mathiowitz (ed.), "Encyclopedia of Controlled Drug Delivery", New York: John Wiley & Sons, Inc., 1999, p. 729.
4. M. Ozyazici, E.H. Gökçe, G. Ertan, Release and diffusional modeling of metronidazole lipid matrices, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **63**(3), 331-339 (2006).
5. X. Wen, A. Nokhodchi, A. Rajabi-Siahboomi, Oral extended release hydrophilic matrices: Formulation and design. In: "Oral controlled release formulation design and drug delivery: Theory to practice", H. Wen, K. Park (eds.), John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, 2010, pp. 89-100.
6. D.L. Wise (ed.), "Handbook of pharmaceutical controlled release technology", CRC Press, London, 2000, pp. 193 y 443.
7. A. Rajabi-Siahboomi, M.P. Jordan, Slow release HPMC matrix systems, *Eur. Pharm. Rev.*, **5**, 21-23 (2000).
8. S. Tiwari, A. Rajabi-Siahboomi, "Drug delivery systems", Humana Press; 1 edition (March 7, 2008) Chapter 11.
9. S.B. Tiwari, A.R. Rajabi-Siahboomi, Extended-release oral drug delivery technologies: Monolithic matrix systems, *Methods Mol. Biol.*, **437**, 217-243 (2008).
10. H. Wei, R. Löbenberg, Biorelevant dissolution media as a predictive tool for glyburide a class II drug, *Eur. J. Pharm. Sci.*, **29**(1), 45-52 (2006).
11. J.J. Dressman, J. Kramer, "Pharmaceutical dissolution testing", CRC Press, Taylor & Francis Group LLC, Atlanta, 2005, pp. 195-224.
12. J. Dressman, C. Reppas, In vitro-in vivo correlations for lipophilic, poorly water-soluble drugs, *Eur. J. Pharm. Sci.*, **11**(Suppl 2), S73-S80 (2000).
13. S. Azarmi, W. Roa, R. Löbenberg, Current perspectives in dissolution testing of conventional and novel dosage forms, *Int. J. Pharm.*, **328**(1), 12-21 (2006).

14. M. Marques, Dissolution media simulating fasted and fed states (mayo 2004), *Dissolution technologies*, URL: http://www.dissolutiontech.com/DTresour/200405Articles/DT200405_A03.pdf, consultado el 18 de septiembre de 2015.
15. M.X. Guo, "Oral controlled release formulation design and drug delivery: Theory to practice", H. Wen, K. Park (eds.), Wiley, New York, 2010, p. 245.
16. S. Klein, Predicting food effects on drug release from extended-release oral dosage forms containing a narrow therapeutic index drug (agosto 2009), *Dissolution technologies*, pp.28-40, URL: http://www.dissolutiontech.com/DTresour/200908Articles/DT200908_A04.pdf.
17. D. Ferrizzi, A. Rajabi-Siahboomi, Evaluation of verapamil hydrochloride (240 mg) extended release matrix formulations using USP apparatus 3 in biorelevant dissolution media, URL: <http://abstracts.aapspharmaceutica.com/expoaaps06/cc/forms/attendee/index.aspx?content=sessionInfo&sessionId=2112>.
18. E. Jantravid, V. de Maio, E. Ronda, V. Mattavelli, M. Vertzoni, J. Dressman, Application of biorelevant dissolution tests to the prediction of in vivo performance of diclofenac sodium from an oral modified-release pellet dosage form, *Eur. J. Pharm. Sci.* 37(3-4), 434-441 (2009).
19. United States Pharmacopeia and National Formulary (USP 32 - NF 27), Diclofenac sodium extended-release tablets. En: "The United States Pharmacopeia Convention". Rockville, Maryland, 2009.
20. R. Korsmeyer, R. Gurny, E. Doelker, P. Buri, N. Peppas, Mechanisms of potassium chloride release from compressed, hydrophilic, polymeric matrices: Effect of entrapped air, *J. Pharm. Sci.*, 72, 1189-1191 (1983).
21. J. Ford, K. Mitchell, P. Rowe, D. Armstrong, P. Elliott, C. Rostron, J. Hogan, Mathematical modeling of drug release from hydroxypropylmethylcellulose matrices: Effect of temperature, *Int. J. Pharm.*, 71, 95-104 (1991).
22. P. Sandoval, "Preformulación de tabletas de diclofenaco sódico de liberación extendida del tipo matriz hidrofílica y estudio de la cinética de liberación en medios de disolución biorrelevantes", Tesis de Magíster en Ciencias Farmacéuticas, Departamento de Farmacia, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, 2013.
23. N.K. Ebube, A. Hikal, C.M. Wyandt, D.C. Beer, L.G. Miller, A.B. Jones, Sustained release of acetaminophen from heterogeneous matrix tablets: Influence of

- polymer ratio, polymer loading, and co-active on drug release, *Pharm. Dev. Technol.*, **2**, 161-170 (1997).
24. M. Levina, A. Rajabi-Siahboomi, The influence of excipients on drug release from hydroxypropyl methylcellulose matrices, *J. Pharm. Sci.*, **93**, 2746-2754 (2004).
25. R. Espinoza, E. Hong, L. Villafuerte, Influence of admixed citric acid on the release profile of pelanserine hydrochloride from HPMC matrix tablets, *Int. J. Pharm.*, **201**, 165-173 (2000).
26. P. Todd, J. L'Hôte-Gaston, M. Sheick, Comparison of swelling, erosion, and gel strength of polyethylene oxide and hypromellose, URL: http://www.colorcon.com/literature/marketing/mr/Extended%20Release/Methocel/English/AAPS2008_L'Hote-Gaston_Technical_Paper_2008-11-13.pdf.

Determinación de hidroquinona usando un electrodo de carbono vítreo modificado con quitosano, nanotubos de carbono de pared múltiple y líquido iónico. Posible uso como sensor

Laura Scarpetta¹, Adrián Mariño¹, Karen Bolaños¹, Yaritza Leiva¹, Paola Castiblanco¹, Édgar Nagles^{2*}

¹ Universidad de la Amazonia, Facultad de Ciencias Básicas, Programa de Química, Florencia, Colombia. Campus Porvenir. Calle 17, diagonal 17 con carrera 3F.

² Universidad de Ibagué, Facultad de Ciencias Naturales y Matemáticas, Ibagué, Colombia. Carrera 22, calle 67 B/Ambalá.

*Correo electrónico: edgar.nagles@unibague.edu.co.

Recibido para evaluación: 25 de abril de 2015.

Aceptado para publicación: 22 de septiembre de 2015.

RESUMEN

La propiedad electroactiva de hidroquinona (HQ) se estudió sobre un electrodo de carbono vítreo modificado con quitosano, nanotubos de carbono de pared múltiple (Ch-MWCNT-GCE). La HQ se depositó a un potencial controlado sobre la superficie del electrodo y la oxidación de la HQ se midió por voltametría de onda cuadrada (SWV, por sus siglas en inglés). Se observó una corriente de oxidación a 0,39 V y una corriente de reducción a 0,21 V con un ΔV de 0,18 V; ello indicó un proceso reversible. Un aumento en las corrientes de oxidación y de reducción de casi 50% se observó cuando el Ch-MWCNT-GCE se recubrió con líquido iónico (LI). El electrodo se caracterizó por voltamperometría cíclica (CV, por sus siglas en inglés) en presencia y sin la presencia de diferentes líquidos iónicos con distinto anión, siendo el más óptimo el líquido iónico (LI) 1-butil-3-metilimidazolio hexafluorofosfato (BMIMPF₆). Se estudiaron las variables experimentales como pH, tiempo de adsorción (τ_{ads}) y potencial de adsorción (E_{ads}), así como también las potenciales interferencias. Bajo las óptimas condiciones (pH 3,0; τ_{acc} 60s; E_{acc} 0,10 V), el pico de la corriente es proporcional a la concentración de HQ entre $4,20 \times 10^{-6}$ y $30,0 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹, con un límite de detección de $2,45 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹. La desviación estándar relativa para una solución que contiene $1,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ de HQ, fue de 1,5% para siete medidas iguales. El método se validó con una muestra de agua dopada con HQ.

Palabras clave: hidroquinona, voltamperometría de adsorción, electrodo modificado, líquido iónico.

SUMMARY

Determination of hydroquinone using a glassy carbon electrode modified with chitosan, multi-wall carbon nano-tubes and ionic liquid. Possible use as sensor

Property of the electroactive hydroquinone (HQ) was studied on a glassy carbon electrode modified chitosan, multi wall carbon nanotubes (Ch-MWCNT-GCE). HQ is deposited at a controlled potential to the electrode surface and oxidation of HQ is measured by square wave voltammetry (SWV). An oxidation current to 0.39 V and a reduction current to 0.21 V with a 0.18 ΔV indicating a reversible process were observed. An increase in the flow of oxidation and reduction of almost 50% was observed when the Ch-MWCNT-GCE was coated with ionic liquid (LI). The electrode was characterized by cyclic voltammetry (CV) in the presence and without the presence of different ionic liquids with different anion being the most optimal ionic liquid (LI) 1-butyl-3-methylimidazolium hexafluorophosphate (BMIMPF₆). Experimental variables such as pH, adsorption time (TADs) and adsorption potential (E_{ads}), as well as potential interference, were studied. Under optimal conditions (pH 3.0; τ_{acc} 60s; E_{acc} 0.10 V) the peak current is proportional to the concentration of HQ between 4.20×10^{-6} and 30.0×10^{-5} mol L⁻¹ with a detection limit of 2.45×10^{-7} mol L⁻¹. The relative standard deviation for a solution containing 1.0×10^{-4} mol L⁻¹ HQ was 1.5% for seven equal measures. The method was validated with a water sample doped with HQ.

Key words: Hydroquinone, adsorption voltammetry, modified electrode, ionic liquid.

INTRODUCCIÓN

La hidroquinona (HQ) (figura 1), cuya denominación de la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC, por sus siglas en inglés) es benceno-1,4-diol, es un compuesto fenólico usado ampliamente como antioxidante, agente inhibidor, colorante, y en muchos más procesos industriales gracias a sus propiedades biológicas y químicas. Sin embargo, debido a la toxicidad que presenta en los seres humanos y la dificultad en su degradación, se convierte en un contaminante ambiental peligroso [1]. De ahí la necesidad del desarrollo de nuevas metodologías que permitan su determinación.

Algunas de las técnicas más usadas en la determinación de HQ son la cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC, por sus siglas en inglés) [2] y la espectrofotometría [3]. Por otro lado, las técnicas electroanalíticas han empezado a llamar la atención gracias a su bajo costo, fácil operación y gran sensibilidad. La innovación de esta técnica radica en la optimización del electrodo modificado, el cual incrementa la sensibilidad y la selectividad. Por esta técnica se ha cuantificado la HQ, usando una gran variedad de electrodos modificados. Algunos son: grafeno-quitosano [4], nanotubos de carbono [5, 6], poli(3,4-etilenedioxitiofeno) sobre electrodo de oro [7] y nanopartículas de oro [8]. Los cuales presentan límites de detección por debajo de $1,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$. Además, el uso de líquidos iónicos en la modificación de electrodos usados en la determinación de hidroquinona se ha incrementado debido al aumento de la señal, la cual mejora la sensibilidad. Algunos líquidos iónicos usados para determinar la HQ por técnicas electroquímicas son: 1-butil-3-metilimidazolio hexafluoroborato (BMIMBF₆) [8], 3-etil-1-vinilimidazolio tetrafluoroborato (EVIMBF₄) [6], 1-butil-3-metilimidazolio hexafluorofosfato (BMIMPF₆) [9] y 1-butilpiridinio hexafluorofosfato (BPPF₆) [10]. El efecto positivo de los líquidos iónicos en la modificación de electrodos se puede explicar con base en sus propiedades conductoras y la amplia ventana electroquímica que presentan [11].

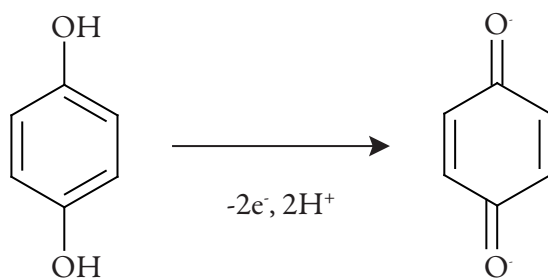


Figura 1. Estructura molecular y proceso de oxidación de hidroquinona (HQ).

PARTE EXPERIMENTAL

Reactivos

El agua empleada para la preparación de disoluciones se obtuvo del sistema MiliQ. 18 MΩ cm. Las disoluciones de patrones con $2,0 \times 10^{-3}$ y $2,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de HQ se prepararon a partir del reactivo puro de Sigma-Aldrich. Las disoluciones de tampones de fosfato se prepararon a partir del ácido fosfórico y ajustando el pH requerido con disolución de NaOH $2,0 \text{ mol L}^{-1}$ y diluyendo 10 veces con agua, LI: 1-etil-3-metilimidazolio trifluorometanosulfonato ([EMIM]F₃MSO₃), 1-butil-3-metilimidazolio tetrafluoroborato

([BMIM]BF₄) y 1-butil-3-metilimidazolio hexafluorofosfato ([BMIM]PF₆). Se obtuvieron de Merck: pureza del 99%, nanotubos de carbono de pared múltiple Ø 5-10 nm, altura 0,5-20 µm; pureza ≥ 95% y quitosano se adquirieron de Sigma-Aldrich.

Instrumentos y equipos

Para el desarrollo de las medidas voltamperométricas se utilizó un analizador voltamétrico VA Computrace (Metrohm). La celda consta de un sistema de tres electrodos: un electrodo de trabajo de carbono vítreo (GC, por sus siglas en inglés), un electrodo de referencia de Ag/AgCl/KCl 3 mol L⁻¹, un alambre de platino como electrodo auxiliar y barra para agitación. En la preparación de los tampones se utilizó un pH-metro Orion 430 con electrodo de membrana de vidrio.

Procedimiento

En la celda electroquímica se agregó 9,0 mL de agua desionizada 18 MΩ cm y 1,0 mL de tampón; no es necesario degasificar. Se trazó el blanco. Posteriormente, se agregó HQ entre $2,0 \times 10^{-7}$ y $2,0 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ para voltamperometría de onda cuadrada (SWAdSV) y $2,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ para voltamperometría cíclica (CV) y se trazó el respectivo voltamperograma de HQ. En las curvas de calibrado se adicionó la misma cantidad de agua desionizada, y tampón.

Preparación del electrodo de trabajo (Ch-MWCNT-LI-GCE)

Antes de cada medición, el electrodo de carbono vítreo (GC) se pulió para limpiar completamente su superficie, utilizando sílice en suspensión (Al₂O₃) de 0,3 y 0,05 µm, se enjuagó con HNO₃ 0,3 mol L⁻¹, agua y metanol durante cinco minutos en un baño ultrasónico, y se secó con N₂. La preparación del electrodo modificado Ch-MWCNT-IL fue desarrollado como reporta Nagles et al. [12]. El electrodo de carbono vítreo Ch-MWCNT-IL recién preparado se sometió a 10 ciclos de potencial entre 0,00 a 1,20 V (0,10 mV s⁻¹) para obtener una superficie estable, reproducible y limpia. El mismo electrodo se usó en una serie de mediciones. La figura 2 muestra el proceso de modificación.

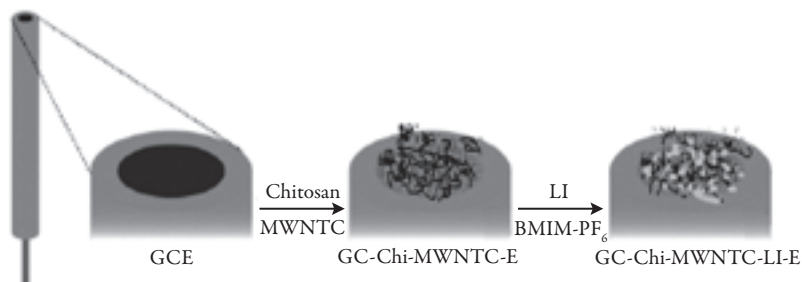


Figura 2. Preparación del electrodo modificado.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Caracterización del electrodo de trabajo (Ch-MWCNT-LI-GCE) con HQ

La respuesta de HQ sobre un electrodo de carbono vítreo modificado con Ch-MWCNT se muestra en la figura 3. Con $9,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de HQ. En *buffer* acetato de pH 3,5 y velocidad de barrido (V) de 100 mV s^{-1} . Se observa claramente una señal de oxidación de HQ a 0,58 V y una señal de reducción a 0,02 V (curva A) con un ΔV de 0,56, indicando un proceso cuasi-reversible. Las señales de óxido-reducción de HQ $9,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ se incrementan más de 200% en la presencia del electrodo modificado con Ch-MWCNT (curva B). Por otro lado, la señal de oxidación cambia a 0,40 V y la de reducción a 0,23 V, con un ΔV de 0,17 V, indicando un proceso más reversible comparado con el electrodo sin modificar. Posiblemente, estos cambios de potencial a menos positivos y menos negativos pueden ser una evidencia de un proceso catalítico entre la HQ y la superficie del electrodo Ch-MWCNT-GCE.

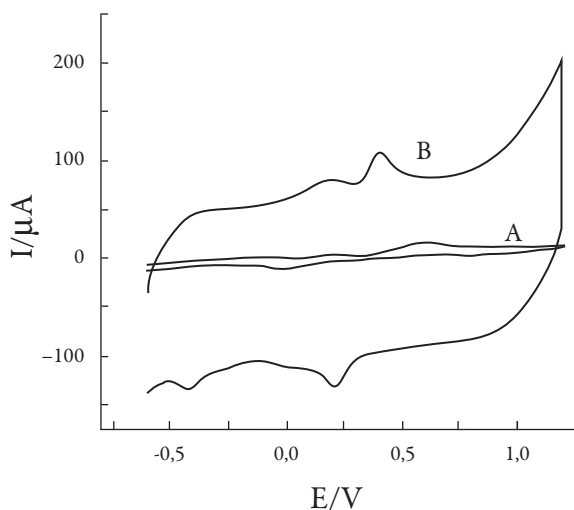


Figura 3. Voltamperogramas cíclicos de HQ: $9,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$; sobre GCE (curva A) y Ch-MWCNT-GCE (curva B). Condiciones: pH 3,5; V: 100 mV s^{-1} .

Cuando el Ch-MWCNT-GCE se modifica con LI ($[\text{BMIM}]\text{PF}_6$), las señales presentan cambios en los potenciales y corrientes de óxido-reducción (figura 4). El ΔE cambia a 0,15 V, facilitando aún más el proceso de óxido-reducción de la hidroquinona. Por otro lado, los valores de corriente de oxidación y de reducción aumentaron casi 50%

(figura 4, A y B), facilitando el depósito de hidroquinona sobre la superficie del electrodo o facilitando el transporte de carga. El electrodo de carbono vítreo modificado con Ch-MWCNT-LI se selecciona como el óptimo y se usó para todas las medidas. Estudios con otros líquidos iónicos con anión diferente como BF_4^- , PF_6^- y F_3MSO_3^- , en orden creciente de tamaño de anión respectivamente, mostraron que el PF_6^- con tamaño mediano era el más favorable, ya que mejoraba la corriente y disminuía el ΔE . Se seleccionó como óptimo para todas las medidas.

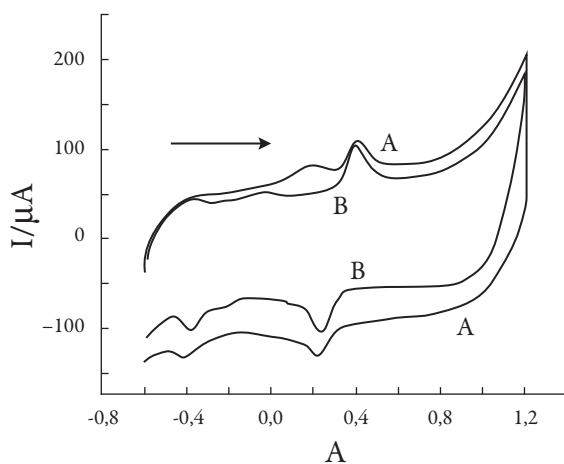


Figura 4. Voltamperogramas cíclicos de HQ: $9,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$; sobre Ch-MWCNT-GCE (curva A) y Ch-MWCNT-LI-GCE (curva B). Condiciones: pH 3,5; V: 100 mV s^{-1} . LI; [BMIM] PF_6 .

Estudio en función del pH

El pH es un parámetro importante que influye en la corriente y el potencial redox. La desprotonación de los dos grupos OH^- de HQ produce la señal de oxidación y de reducción. A valores de pH mayores de 3,5 sucede la desprotonación química de dichos grupos disminuyendo la corriente. A valores de pH menores, la HQ está protonada y la corriente de oxidación se incrementa. Este estudio se realizó por (CV) con HQ: $9,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, y se varió el pH de la disolución entre 2,0 y 9,0 utilizando 1 mL de sistema tampón ($\text{H}_3\text{PO}_4/\text{H}_2\text{PO}_4^-$), ($\text{CH}_3\text{COOH}/\text{CH}_3\text{COO}^-$) y ($\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$) de concentración $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. Se aplicó una velocidad de barrido (V) de 100 mV s^{-1} . Los resultados se presentan en la figura 5. Como se muestra, la mayor corriente de pico se obtuvo a pH 3,2 y luego a pH mayores decrece rápidamente. Este valor de pH fue usado en los estudios posteriores.

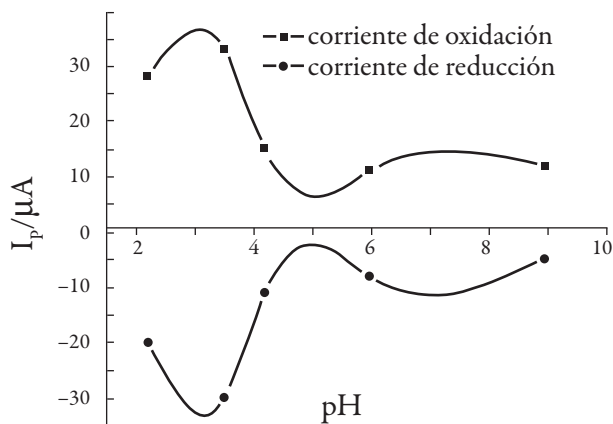


Figura 5. Efecto del pH en la corriente de oxidación y reducción de HQ: $9,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$; sobre Ch-MWCNT-LI-GCE, velocidad de barrido (V) de 100 mV s^{-1} .

Efecto de la velocidad de barrido (V)

La figura 6 muestra el efecto de la raíz cuadrada de la velocidad de barrido (V)^{1/2} sobre la corriente de pico de HQ: $9,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. Los resultados muestran un incremento proporcional de la corriente de pico entre 3,0 y 7,0 (V)^{1/2}. Esto indica que el proceso electroquímico es controlado por difusión. A valores mayores de (V)^{1/2} la corriente de pico decrece, indicando que la transferencia de carga no es rápida. Resultados similar a los reportados por Liu *et al.* [9].

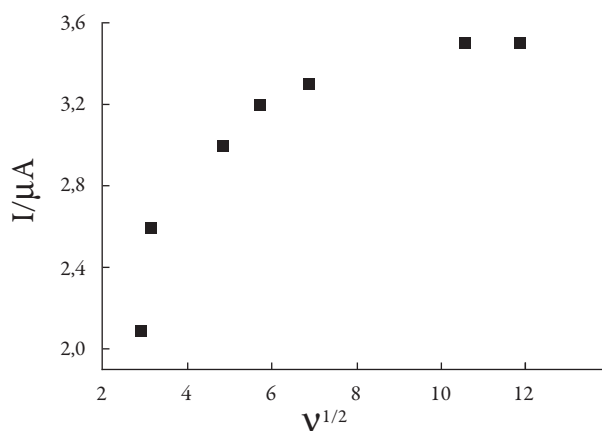


Figura 6. Efecto de la raíz cuadrada de la velocidad de barrido ($V^{1/2}$) en la corriente de oxidación; pH 3,2.

Estudio en función del potencial de adsorción (E_{ads})

Este estudio se realizó utilizando HQ: $9,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, y se varió el potencial de adsorción entre 0,0 y 0,9 V por voltamperometría de onda cuadrada (SWAdV), mientras las otras condiciones permanecieron constantes: pH 3,2; t_{ads} 60 s. La corriente de pico aumenta hasta un potencial de adsorción de 0,10 V para luego decrecer proporcionalmente. El valor de 0,10 V fue elegido para las posteriores mediciones.

Estudio en función del tiempo de acumulación (t_{ads})

En este estudio se utilizó HQ: $1,65 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, y se varió el tiempo de adsorción entre 0,0 y 100 s por voltamperometría de onda cuadrada (SWAdV), mientras las otras condiciones permanecieron constantes: pH 3,2; E_{ads} : 0,10 V. La corriente de pico aumenta con el t_{ads} hasta 60 s y luego decrece ligeramente, tal vez por la saturación de la superficie del electrodo. Se escogió el t_{ads} de 60 s.

Parámetros de la técnica en la etapa de barrido

La onda cuadrada se optimizó con una frecuencia de 15 Hz, un potencial del escalón de 4 mV y una amplitud del pulso de 40 mV. A otros valores diferentes se pierde la forma del pico de oxidación.

Construcción de curva de calibración

La figura 7 muestra los voltamperogramas de adsorción en función de la concentración de HQ sobre Ch-MWCNT-LI-GCE. Condiciones experimentales: pH 3,2 (100 μL de tampón fosfato $0,4 \text{ mol L}^{-1}$); t_{ads} : 60 s y E_{ads} : 0,10 V.

La curva de calibrado de HQ tiene un rango de concentración entre $4,20 \times 10^{-6}$ y $30,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. La precisión expresada como la desviación estándar relativa (RSD, por sus siglas en inglés) fue de 1,5% para siete medidas consecutivas de la misma muestra, con un contenido de $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de HQ. El límite de detección (LD), según el método de Miller y Miller [13], fue de $2,45 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$.

Validación y estudio de interferencias

Se validó la metodología usando muestras dopadas de agua MilliQ con $5,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ de HQ. Cuantificando por el método de adición de estándar se obtuvieron valores entre $4,2$ y $3,7 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ con un error relativo de -13% . Colorantes como amaranto y tartracina no interfieren. Por otro lado, la presencia de catecol interfiere con el análisis de HQ por el método propuesto. La optimización del electrodo puede ser usada en otro tipo de matrices y su estudio quedaría abierto a futuras investigaciones.

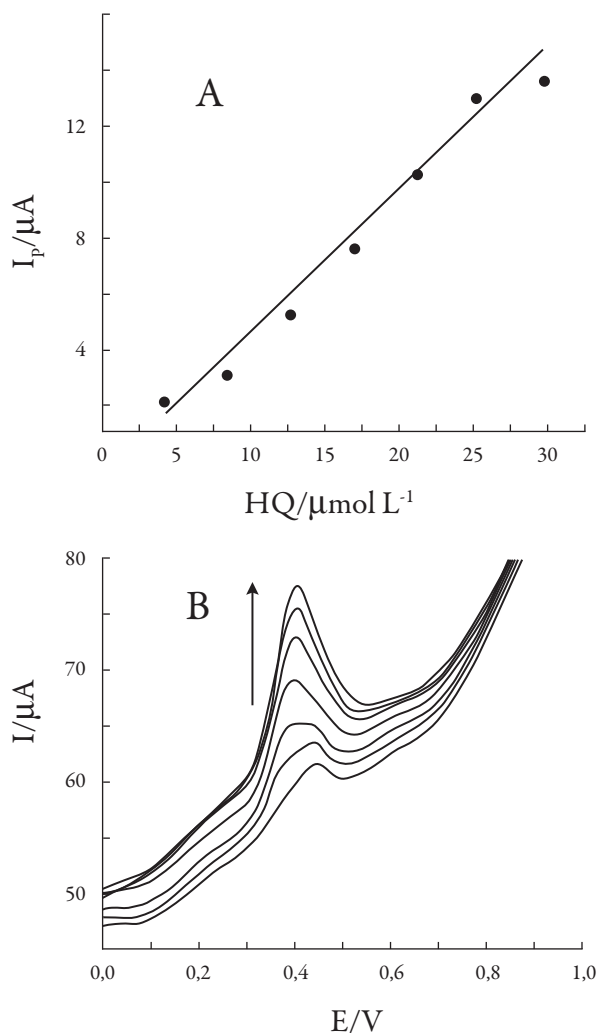


Figura 7. Curva de calibración. A) voltamperogramas de adsorción, B) de HQ; pH 3,2; τ_{ads} : 60 s; E_{ads} 0,10 V.

CONCLUSIONES

El electrodo modificado con Ch-MWCNT-LI-GCE es muy conveniente para la cuantificación de HQ. El método propuesto es sencillo, de bajo costo y es conveniente para determinar la HQ en matrices que contienen colorantes o en fármacos usados en dermatología.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a la Universidad de Ibagué, por su apoyo a la investigación con el proyecto 15-343-INT, y a la Universidad de la Amazonia, por el proyecto de semillero de electroquímica.

REFERENCIAS

1. H. Kunyun, W. Xingsheng, M. Xianghai, Z. Haitao, S. Shin-ichiro, Amperometric determination of hydroquinone and catechol on gold electrode modified by direct electrodeposition of poly(3,4-ethylenedioxythiophene), *Sensors and Actuators B*, **193**, 212 (2014).
2. G. Marrubini, E. Calleri, T. Coccini, A. Castoldi, L. Manzo, Direct analysis of phenol, catechol and hydroquinone in human urine by coupled-column HPLC with fluorimetric detection, *Chromatographia*, **62**, 25 (2005).
3. A. Afkhami, H. Khatami, Indirect kinetic-spectrophotometric determination of resorcinol, catechol, and hydroquinone, *J. Anal. Chem.*, **56**, 429 (2001).
4. H. Yina, Q. Zhang, Y. Zhou, Q. Ma, T. Liu, L. Zhu, S. Ai, Electrochemical behavior of catechol, resorcinol and hydroquinone at graphene-chitosan composite film modified glassy carbon electrode and their simultaneous determination in water samples, *Electrochim. Acta*, **56**, 2748 (2011).
5. C. Bu, X. Liu, Y. Zhang, L. Li, X. Zhou, X. Lu, A sensor based on the carbon nanotubes-ionic liquid composite for simultaneous determination of hydroquinone and catechol, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, **88**, 292 (2011).
6. X. Feng, W. Gao, S. Zhou, H. Shi, H. Huang, W. Song, Discrimination and simultaneous determination of hydroquinone and catechol by tunable polymerization of imidazolium-based ionic liquid on multi-walled carbon nanotube surfaces, *Anal. Chim. Acta*, **805**, 36 (2013).
7. K. He, X. Wang, X. Meng, H. Zheng, S. Suye, Amperometric determination of hydroquinone and catechol on gold electrode modified by direct electrodeposition of poly(3,4-ethylenedioxythiophene), *Sensors and Actuators B*, **193**, 212 (2014).

8. S. Hu, Y. Wang, X. Wang, L. Xu, J. Xiang, W. Sun, Electrochemical detection of hydroquinone with a gold nanoparticle and graphene modified carbon ionic liquid electrode, *Sensors and Actuators B*, **168**, 27 (2012).
9. X. Liu, Z. Ding, Y. He, Z. Xue, X. Zhao, X. Lu, Electrochemical behavior of hydroquinone at multi-walled carbon nanotubes and ionic liquid composite film modified electrode, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, **79**, 27 (2010).
10. W. Sun, Y. Wang, Y. Lu, A. Hu, F. Shi, Z. Sun, High sensitive simultaneously electrochemical detection of hydroquinone and catechol with a poly(crystal violet) functionalized graphene modified carbon ionic liquid electrode, *Sensors and Actuators B*, **188**, 564 (2013).
11. N. Guzmán, J. Fernández, M. Parada, C. Orbegozo, M. Rodríguez, A. Padrón, Cation, anion and co-ion effect on the aggregation of ionic liquids in aqueous solution, *Quim. Nova*, **33**, 1703 (2010).
12. É. Nagles, P. Álvarez, V. Arancibia, M. Báez, V. Garretón, N. Ehrenfeld, Amperometric and voltammetric determination of oxytetracycline in trout salmonid muscle using multi-wall carbon nanotube, ionic liquid and gold nanoparticle film electrodes, *Int. J. Electrochem. Sci.*, **7**, 11745 (2012).
13. J.C. Miller, J.N. Miller, "Estadística y quimiometría para química analítica", 4^a ed., Addison-Wesley, Madrid, 2002, pp. 124-125.

Usos terapéuticos potenciales de los antagonistas opioides: Fisiopatología y evidencia preclínica

Mauricio O. Nava-Mesa^{1*}, Angélica Téllez-Arévalo^{2,3**}, Daniel Rojas-Kozhakin^{1***}, Carlos A. Calderón-Ospina^{3****}

¹ Escuela de Medicina y Ciencias de la Salud. Unidad de Neurociencia, Grupo de Investigación en Neurociencia (Neuros). Universidad del Rosario. Carrera 24 N° 63C-69. Bogotá, D. C., Colombia.

² Toxicóloga Clínica Universidad del Rosario. Residente de Farmacología Clínica Universidad de La Sabana.

³ Escuela de Medicina y Ciencias de la Salud. Unidad de Farmacología, Universidad del Rosario. Carrera 24 N° 63C-69. Bogotá, D. C., Colombia.

Correos electrónicos: *mauricio.nava@urosario.edu.co; **tellez.angelica@urosario.edu.co; ***rojask.daniel@urosario.edu.co; ****carlos.calderon@urosario.edu.co.

Recibido para evaluación: 5 de noviembre de 2014.

Aceptado para publicación: 11 de octubre de 2015.

RESUMEN

El sistema opioide, del cual forman parte los péptidos opioides endógenos y sus receptores (Miu, Kappa, delta y ORL), tiene un papel importante en la fisiología de diferentes sistemas. Existe una creciente evidencia de su participación en la fisiopatología de múltiples trastornos del sistema nervioso central, endocrino e inmunológico. La modulación del sistema opioide mediante el uso de antagonistas específicos o inespecíficos de sus receptores puede tener un papel terapéutico en el manejo sintomático de diferentes contextos, incluyendo la intoxicación aguda por opiáceos, la dependencia a opioides, y la reducción de reacciones adversas de agonistas opioides utilizados en el manejo del dolor crónico. El presente trabajo tiene como objetivo revisar la farmacología de los antagonistas opioides específicos e inespecíficos, y realizar una actualización de sus posibles nuevas indicaciones y usos terapéuticos.

Palabras clave: antagonistas opiáceos, sistema opioide, trastornos relacionados con el sistema opioide.

SUMMARY

Potential therapeutic uses of opioid antagonists: Pathophysiology and preclinical evidence

Opioid system, which involved endogenous opioid peptides and their receptors (Miu, Kappa, delta and ORL), has a main role in the physiology of several systems. At the same time, there is cumulating evidence in the role of the opioid system in the physiopathology of several disorders in the central nervous, endocrine and immunological system. The modulation of the opioid system using nonspecific antagonists may have a therapeutic role in the symptomatic management of several diseases, as well as, in the emergency management of opioid analgesic overdose, opioid dependence and to reduce the drug side effects of the opioid agonists used in chronic pain. This paper aims to review the pharmacology of specific and nonspecific opioid antagonists, and update on possible new indications and therapeutic uses of such antagonists.

Key words: Opiate antagonist, opioid system, opioid-related disorders.

INTRODUCCIÓN

La palabra *opium* proviene del griego *opos* que significa ‘jugo’, haciendo referencia al jugo derivado de la planta *Papaver somniferum*. A pesar de la gran controversia con el uso de los términos, opiáceo hace referencia a los alcaloides derivados de la morfina y del opio, que pueden ser de origen natural o sintético; mientras que los péptidos opioides endógenos son los ligandos naturales para los receptores opioides [1]. Se han identificado tres familias diferentes de opioides endógenos: endorfinas, encefalinas y dinorfinas, cada una derivada de polipéptidos diferentes. Las endorfinas derivadas de la prepropiomelanocortina, las encefalinas de la preproencefalina y la dinorfina de la preprodinorfina. En años recientes se han descrito nuevos péptidos opioides (nociceptina/orfanina y endomorfina) con propiedades diferentes a los tres péptidos opioides ya descritos [2, 3]. Gran parte de los efectos fisiológicos de estos opioides endógenos involucra los sistemas de modulación del dolor, de tal manera que los opiáceos han sido ampliamente utilizados como analgésicos. Uno de los primeros y más utilizados de dichos analgésicos es la morfina, la cual fue aislada por Sertürner en 1806 [4]. A pesar de sus efectos adversos y potencial adictivo, es uno de los analgésicos más utilizados. Por otro lado, en 1942 Weijlard y Erikson desarrollaron la nalorfina, fármaco con capacidad de revertir la depresión respiratoria producida por la morfina y acelerar el sín-

drome de abstinencia, conservando un efecto analgésico menor; es el primer opioide con acción agonista-antagonista mixta [4]. Gran parte de los antagonistas opioides son utilizados en la práctica clínica cotidiana, con el fin de revertir los efectos adversos generados por la intoxicación por opiáceos; sin embargo, dada la distribución del sistema opioide (opioides y sus receptores) en el sistema nervioso, así como la diversidad de sus funciones fisiológicas y, finalmente, su papel en la fisiopatología de múltiples trastornos, hace que los antagonistas de los receptores opioides puedan tener muchas indicaciones en diferentes enfermedades y trastornos del sistema nervioso central y periférico. La presente revisión tiene como objetivo actualizar la farmacología básica de los antagonistas opioides, con énfasis en la identificación de nuevos “blancos” de acción farmacológicos en aquellas entidades clínicas, cuya fisiopatología involucra el sistema opioide. Además, se discutirán posibles usos en dichas patologías y se señala el estatus de desarrollo clínico actual.

Efectos fisiológicos de los opioides

Los opioides actúan sobre los receptores μ (Miu), κ (Kappa), δ (delta) (OPRM, OPRK y OPRD) y ORL-1 (*opioid receptor like-1*). Estos receptores pertenecen a la familia de receptores acoplados a proteína Gi; de esta manera, inhiben la adenilciclasa y canales de calcio dependientes de voltaje y estimulan canales de potasio y la fosfodiesterasa C. Al disminuir el AMPc intracelular, los opioides modulan la liberación de neurotransmisores como la sustancia P, GABA, dopamina, acetilcolina y norepinefrina y ejercen una variedad de efectos dependiendo del tipo de receptor estimulado [5].

La estimulación de receptores δ ha sido asociada con efectos antinociceptivos y estimulantes del apetito. La de receptores μ con analgesia, euforia, depresión respiratoria, miosis, disminución de la motilidad gastrointestinal, supresión de la tos, sedación, somnolencia y dependencia física [6].

Los receptores κ , al igual que los receptores μ , inducen analgesia, miosis y depresión respiratoria, pero también se han asociado con disforia, efectos psicomiméticos y trastornos del ánimo (estrés, depresión y ansiedad). Por último, los receptores ORL-1 participan en una variedad de funciones biológicas a nivel cardiovascular, renal, gastrointestinal y en procesos como nocicepción, memoria y ansiedad [6].

Crónicamente, la estimulación de receptores desencadena tolerancia, hiperalgesia y dependencia. Estas condiciones se presentan por regulación a la baja y desensibilización de los receptores, incremento del AMP cíclico intracelular [5, 7] y un efecto excitatorio por acople a la subunidad Gs del receptor opioide [8].

En la tabla 1 se enumeran algunos de los efectos de fármacos opioides con el mecanismo involucrado.

Tabla 1. Efectos de fármacos opioides y su mecanismo.

Efecto	Mecanismo asociado
Analgesia	Cambios en la percepción del dolor espinal (receptores μ 2, δ , κ) y supraespinal (μ 1 y κ 3).
Efectos estimulantes	Inhibición de la liberación de neurotransmisores inhibidores tales como GABA y acetilcolina [9].
Supresión de la tos	Acción directa de receptores μ y κ en el sistema nervioso central [10].
Estreñimiento, dolor abdominal y síndrome intestinal por narcóticos [11]	Aumento del tono en el músculo longitudinal intestinal e inhibición de la contracción de la propulsión de músculos circulares y longitudinales. Disminución de las secreciones gástricas, pancreáticas y biliares.
Náuseas y vómito	Efecto de los opioides sobre receptores en la médula oblonga, inhibición de la motilidad gastrointestinal y estimulación del aparato vestibular (mediación de receptores opioides μ , δ , D2 de dopamina y serotoninérgicos) [12].
Retención urinaria	Aumento del tono del músculo detrusor de la vejiga, los uréteres y del esfínter vesical [12].
Reducción del gasto urinario y la excreción renal de sodio	Estimulación de la liberación de hormona antidiurética [13].
Miosis	Acción excitatoria en el segmento autónomo del núcleo del nervio oculomotor.
Depresión respiratoria	Acción directa en los centros respiratorios en el tronco cerebral. Los niveles necesarios para inducir analgesia son inferiores a los niveles requeridos para generar una depresión respiratoria significativa. Sin embargo, en pacientes con determinadas condiciones como apnea obstructiva del sueño, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, trastornos neurológicos, obesidad, edad avanzada, insuficiencia renal y hepática, o pacientes que se encuentren en tratamiento con otros depresores del sistema nervioso central son más susceptibles a los efectos depresores respiratorios [14].
Efectos a nivel cardiovascular (hipotensión, depresión miocárdica y alteraciones electrocardiográficas como aumento del PR, QRS y QTc) [6]	La hipotensión se genera por aumento en la liberación de histamina y la depresión del centro vasomotor en la médula; las alteraciones electrocardiográficas son secundarias al bloqueo de canales de sodio, potasio y calcio [15]. Uno de los opioides con mayor relación con incremento del QTc y riesgo de <i>torsades de pointes</i> durante el tratamiento es la metadona, especialmente en pacientes de género femenino, pacientes que presentan enfermedad cardíaca estructural, disfunción hepática, que toman otros medicamentos que prolongan el QT o que ingieran cocaína [16].
Endocrino	Inhiben la liberación somatostatina, insulina, glucagón [9]; y de vasopresina [13].
Estrés, ansiedad, depresión	Aunque los mecanismos por los que la activación del receptor κ induce fenómenos de estrés no son entendidos completamente, estudios recientes sugieren una interacción con la hormona liberadora de corticotropina [6].

Antagonistas opioides

Una variedad de agentes se une competitivamente a uno o más de los receptores opioides, despliegan poca o ninguna actividad intrínseca y antagonizan de manera robusta los efectos de los agonistas de receptores (figura 1).

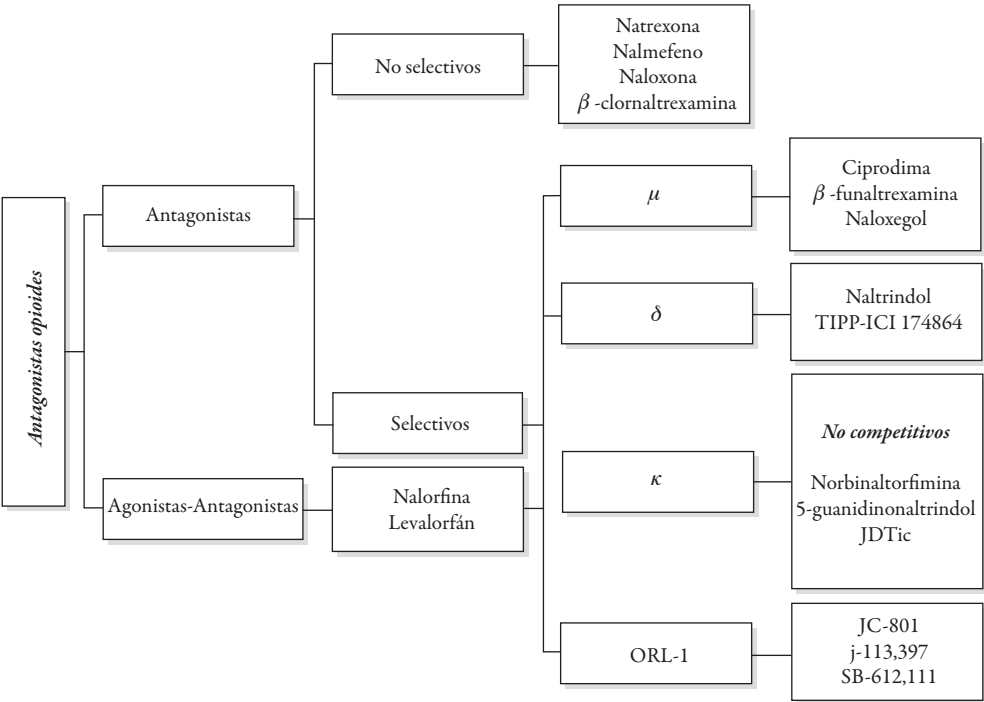


Figura 1. Clasificación de los antagonistas opioides [17-21].

En algunos casos se producen congéneres que son antagonistas competitivos en los receptores μ , pero tienen acciones agonistas en los κ . Nalorfina y levalorfan tienen tales propiedades. Otros congéneres, especialmente naloxona y naltrexona, parecen estar desprovistos de acciones agonistas e interactúan con todos los tipos de receptores opioides, aunque con afinidades diferentes. Por otro lado, nalmefeno es un antagonista μ relativamente puro que es más potente que la naloxona.

Una variedad de antagonistas no peptídicos han sido desarrollados, que son relativamente selectivos por tipos individuales de receptores opioides. Estos incluyen ciprodimina y β funaltrexamina, para μ ; naltrindol para δ ; y norbinaltorfimina para κ , aunque estos agentes no están en uso clínico actualmente [17].

Química de los antagonistas opioides

Cambios en la estructura de un opioide pueden convertir un fármaco que es un agonista, en otro con acciones antagonistas en uno o más tipos de receptores opioides. La más común de tales sustituciones es la de un grupo químico grande (p. ej., un grupo alil o metilciclopropil) por el grupo N-metil que es típico de los agonistas μ . Tales sustituciones transforman la morfina en nalorfina, levorfanol en levalorfan y la oximorfona en naloxona o naltrexona. La naloxona es un derivado N-alil de oximorfona y la naltrexona es derivada de la tebaína con una estructura muy similar a la oximorfona [17].

De la naltrexona se deriva un antagonista de receptores opioides periféricos llamado metilnaltrexona. Este fármaco posee un grupo metilo con un nitrógeno, característica química que incrementa su polaridad, reduciendo el paso a través de la barrera hematoencefálica. La metilnaltrexona antagoniza el receptor μ periférico y tiene una menor afinidad por los receptores κ y δ [22]. El alvimopán es otro antagonista de receptores periféricos, con mayor selectividad sobre receptores μ que la metilnaltrexona. El alvimopán es un compuesto cuaternario, con una forma zwitteriónica que le brinda alto peso molecular y mayor polaridad [22, 23].

El nalexol es un antagonista de receptores μ periféricos que se encuentra en fase III de desarrollo. Es un derivado pegilado de la naloxona y sustrato de la glicoproteína-P, lo que limita su paso a través de la barrera hematoencefálica [21].

En la tabla 2 se resume el perfil farmacocinético en humanos de diferentes antagonistas opioides. La farmacocinética de antagonistas selectivos del receptor κ publicada, se ha determinado en modelos murinos.

Efectos farmacológicos de los antagonistas

La naloxona, el nalmefeno y la naltrexona son antagonistas opioides puros; sin embargo, existen algunas diferencias clínicas entre ellos. La naloxona y el nalmefeno revierten efectos clínicos y tóxicos de los opioides; pero el antagonismo del nalmefeno a diferencia del ejercido por la naloxona, es al menos 5 a 10 veces más prolongado. De esta manera, el nalmefeno revierte la depresión respiratoria, hipotensión y sedación, pero también la analgesia inducida por opioides. Por su parte, la naltrexona revierte efectos clínicos pero no tóxicos. Esto es explicado porque la naltrexona desplaza a opioides endógenos y agonistas opiáceos a dosis terapéuticas; sin embargo, a dosis extremadamente altas, los opioides pueden desplazar a la naltrexona de los receptores [24].

Naloxona, naltrexona y nalmefeno pueden desencadenar síndrome de abstinencia en pacientes con dependencia a opioides, pero ninguno de estos medicamentos presenta fenómenos de tolerancia ni dependencia física o psicológica [24].

Tabla 2. Perfil farmacocinético de los antagonistas opioides en seres humanos. NR: no reportada [19, 21, 22, 25].

Variable	Antagonistas opioides centrales y periféricos			Antagonistas opioides periféricos		
	Naloxona [19]	Naltrexona [19]	Nalmefeno [24]	Metilnaltrexona [22]	Alvimopán [22]	Naloxegol (fase III) [21]
Efecto sobre los receptores	Antagonista competitivo de receptores μ , κ , delta IV, IM, intraósea, SC	Antagonista competitivo de receptores μ , κ , delta VO, IM	Antagonista parcial de receptores μ , κ , delta IV, SC, IM	Antagonista específico de receptores μ periféricos IV, VO, SC	Antagonista específico de receptores μ periféricos VO	Antagonista específico de receptores μ periféricos VO
Vía de administración						
Bd (%)	Vía oral: 6%. La absorción puede ser errática por vías SC o IM	Vía oral: 5%-40%	IM: 93%-100%. SC: 93%-100%	NR	VO: 6%	Absorción rápida
Inicio de acción	Vía intravenosa: 1-2 minutos. Vías intramuscular y subcutánea: 2-5 minutos	< 5 minutos	Vía intravenosa: 30 segundos a 5 minutos	30-60 min	NR	NR
T max	Vías intramuscular y subcutánea: 15 minutos	Vía oral: 1-2	Vía intramuscular: 2-3 horas. Vía subcutánea: 1,5 horas	0,1 h	1,5 h	1,58 h
Unión a proteínas plasmáticas	NR	21%-28%	45%	11%-15%	NR	NR

(Continúa)

Tabla 2. Perfil farmacocinético de los antagonistas opioides en seres humanos. NR: no reportada [19, 21, 22, 25]. (Continuación)

Variable	Antagonistas opioides centrales y periféricos		Antagonistas opioides periféricos			
	Naloxona [19]	Naltrexona [19]	Nalmefeno [24]	Metilnaltrexona [22]	Alvimopán [22]	Naloxegol (fase III) [21]
Vida media (h)	1,28	Naltrexona: 4. El metabolito 6-β-naltrexol: 13	5-15	1-9	10-17	11
Duración de la acción	Vía intravenosa: 15-90 minutos. Vía intramuscular: mayor que la IV	1-3 días	1-4 horas	NR	NR	NR
Metabolismo	Hepático principalmente por glucuronidación. El principal metabolito es naloxona-3-glucurónido	Hepático a 6-β-naltrexol, principalmente. Metabolitos menores: 2-hidroxi-3-metil-naltrexona. La vida media es mayor después de la administración IM: 5-10 días	Hepático por glucuronidación y desalquilación.	Un pequeño porcentaje sufre metabolismo hepático (glucuronidación)	Intestinal	Hepático e intestinal por glucuronidación

(Continúa)

Tabla 2. Perfil farmacocinético de los antagonistas opioides en seres humanos. NR: no reportada [19, 21, 22, 25]. (Continuación)

Variable	Antagonistas opioides centrales y periféricos			Antagonistas opioides periféricos		
	Naloxona [19]	Naltrexona [19]	Nalmefeno [24]	Metilnaltrexona [22]	Alvimopán [22]	Naloxegol (fase III) [21]
Metabolitos activos		6-β-naltrexol tiene actividad antagonista pero menos potente	Los metabolitos tienen mínima o nula actividad farmacológica	Ninguno	ADL-08-0011, producto de hidrólisis de amida	No
Eliminación	Renal 70%	Solo 2% es excretada sin cambios por orina. La vía fecal es una vía menor de eliminación	Renal 83% < 5% sin cambios, fecal 17%	Principalmente renal y cerca del 50% es excretado sin cambios en orina	Principalmente biliar, la eliminación renal es del 35% de la total	Principalmente hepática e intestinal. La depuración renal es mínima

La administración de antagonistas opioides reduce la prevalencia y gravedad de efectos indeseables de opioides como estreñimiento, íleo posoperatorio y vómito. El uso de naloxona para disminuir las reacciones adversas gastrointestinales se encuentra limitado, porque las dosis necesarias para revertir estos efectos son altas y disminuyen el efecto analgésico de los opioides, a diferencia de antagonistas como el alvimopán y metilnaltrexona, cuya actividad antagonista se encuentra restringida a receptores μ periféricos del tracto gastrointestinal, y de esta manera mejoran los síntomas gastrointestinales sin afectar la efectividad antinociceptiva de los opioides. Estos antagonistas periféricos también parecen disminuir la retención urinaria y el prurito inducido por opioides, aunque esta es una reacción adversa mediada por un efecto principalmente central [22].

La modulación de otros efectos inducidos por opioides sobre la angiogénesis y alteraciones inmunológicas también ha sido materia de estudio en el uso de antagonistas opioides. Sobre la angiogénesis, los péptidos opioides presentan efectos estimulantes, incrementando la proliferación, migración y adhesión de células endoteliales. Esto es preocupante en pacientes con cáncer que frecuentemente reciben opioides como terapia analgésica. La naloxona puede antagonizar estos efectos al coadministrarse con agonistas opioides, pero no ha mostrado efectos antiangiogénicos por sí sola [26].

Respecto al sistema inmune, la morfina ha mostrado inducir inmunosupresión severa al intervenir en la inmunidad innata y adaptativa, contribuyendo a la insuficiente depuración bacteriana y pobre curación de heridas [27]. Por otra parte, opioides como la morfina y la metadona, parecen promover la ineffectividad del tratamiento antirretroviral, por inhibición de la secreción de citoquinas que inhiben la expresión del virus de inmunodeficiencia humana y por estimulación de la expresión de correceptores CCR5 y CCR3, importantes en el proceso de entrada del virus a los linfocitos T. La metilnaltrexona, naltrexona y β -funaltrexamina han demostrado antagonizar la replicación de CCR5 por antagonismo sobre receptores [28].

A pesar de que a dosis altas, la naloxona disminuye el efecto analgésico, a dosis bajas, antagonistas opioides como naloxona y naltrexona potencian el efecto analgésico de un opioide coadministrado. El efecto de potenciación analgésica es secundario a la inhibición de la respuesta excitatoria inducida por la exposición prolongada a opioides y que genera fenómenos como tolerancia, dependencia e hiperalgesia. El mecanismo por el que el antagonista opioide a dosis bajas produce mayor acople del receptor opioide por la proteína G inhibitoria (G_i) que por G_s , es su mayor afinidad por la filamina A que por el receptor opioide. La filamina A es una proteína que interfiere con el acople a G_s , generando una respuesta inhibitoria y mejorando la respuesta antinociceptiva del opioide coadministrado [19].

Otro mecanismo que podría explicar los efectos de potenciación analgésica de la naloxona, es una acción antiinflamatoria en la glía de la médula espinal [29], a través de la inhibición del receptor *toll-like* 4 de células gliales que normalmente se encuentra asociado a transmisión glutamatérgica [19]. El incremento de glutamato, en casos de exposición prolongada a morfina, se asocia a la activación de células gliales, sobre expresión de glutamato, fenómenos de hiperalgesia, tolerancia, dependencia y depresión respiratoria inducidas por opioides [30, 31]. La coadministración de dosis bajas de naloxona con morfina revierte la expresión de transportadores de glutamato, inhibe la expresión de receptores NMDA e inhibe la activación glial, conservando los efectos antinociceptivos de la morfina [30].

Además, existe evidencia de que la naloxona a dosis bajas suprime la neuroinflamación inducida por la administración de opioides al incrementar la expresión de citoquinas antiinflamatorias como la IL-10 y mitigar la sobreexpresión de citoquinas proinflamatorias como IL-1 β , inhibir la activación del NF- κ B y de canales de calcio tipo L activados en la respuesta inflamatoria [32, 33].

Bajo circunstancias ordinarias, los antagonistas opioides producen pocos efectos en ausencia de un agonista exógeno. En el sistema endocrino, la administración de naloxona o maltrexona, por ejemplo, incrementa la secreción de la hormona liberadora de gonadotrofinas y de corticotropinas, elevando las concentraciones de LH, FSH, ACTH y hormonas esteroideas. De esta manera, inducen la liberación de prolactina en mujeres y la secreción de cortisol y catecolaminas asociadas a situaciones como estrés y ejercicio [17].

Cuando los sistemas opioides endógenos están activados, la administración de un antagonista opioide puede tener consecuencias visibles. El uso de naloxona en choque séptico, por ejemplo, incrementa la presión arterial, preserva la perfusión tisular y alivia la hipoxia tisular [33]. Por otra parte, el uso de antagonistas del receptor κ en trastornos adictivos y del ánimo en modelos animales, genera efectos ansiolíticos y antidepresivos.

Actualmente se encuentra en etapa clínica fase I, el primer estudio sobre el uso de JD_{Tic} (antagonista del receptor κ) en seres humanos. Este estudio pretende evaluar la seguridad, tolerabilidad y farmacocinética de dosis orales únicas de JD_{Tic} para, posteriormente, poder evaluar su eficacia en pacientes con dependencia a la cocaína [34].

Efectos adversos

La naloxona puede inducir agitación, alteraciones cardiovasculares (hipotensión o hipertensión, arritmias), disnea, edema pulmonar y síndrome de abstinencia a opioides en pacientes dependientes [35]. Con naltrexona se han descrito alteraciones neuro-

lógicas (cefalea, insomnio, confusión, alucinaciones), alteraciones gastrointestinales y anafilactoides. En dosis elevadas, la naloxona puede inducir toxicidad hepática, reportándose casos de elevación de transaminasas, hepatitis y lesión hepatocelular [35].

Las reacciones adversas presentadas con antagonistas opioides periféricos y con el naloxegol son gastrointestinales, principalmente (dolor abdominal, flatulencia, diarrea y náuseas). La metilnaltrexona se ha asociado a hipotensión ortostática, reacción auto-limitada y dosis dependiente, por lo que la dosis máxima sugerida es de 0,3 mg/kg [32]. Por otra parte, el alvimopán frente al placebo mostró un incremento en la incidencia de neoplasias e infarto agudo de miocardio en estudios clínicos a largo plazo [32].

Aplicaciones clínicas de los antagonistas opioides

La mala prescripción, el abuso, así como el creciente uso de los opiáceos en la práctica clínica cotidiana, se relacionan con la sobredosis de los analgésicos opioides [36, 37]. De esta manera, una de las primeras indicaciones para el uso de los antagonistas opioides es, precisamente, el *manejo de la intoxicación con opiáceos*, siendo la naloxona el fármaco de elección [38]. Asimismo, se ha reportado que el mismo fármaco puede ayudar a prevenir el deterioro memorístico en pacientes sometidos a terapia electroconvulsiva y en pacientes que toman opioides crónicamente [39, 40]. Por otro lado, junto con otros antagonistas (p. ej., buprenorfina y naltrexona), los antagonistas pueden ser utilizados como coadyuvantes en el manejo de la adicción a los opioides, adicción al alcohol e incluso, según reportes aislados, en la dependencia a la ketamina [41-45]. Respecto a la naltrexona a bajas dosis, se han reportado beneficios sintomáticos en el caso de la enfermedad de Crohn, fibromialgia, esclerosis múltiple y en otras enfermedades inflamatorias y autoinmunes. No hay evidencia significativa de que dicho tratamiento basado en antagonistas opioides pueda cambiar el curso natural de las patologías mencionadas anteriormente; sin embargo, puede ser una herramienta útil para reducir el número de agudizaciones y exacerbaciones. Finalmente, el uso combinado de los agonistas junto con los antagonistas de receptores opioides puede reducir los efectos adversos de dichos agonistas [46-54]. Al final de este capítulo, se discutirá la evidencia clínica y el uso tradicional de los antagonistas opiáceos en indicaciones ya aprobadas.

Otras aplicaciones

A continuación presentamos evidencia tanto clínica como experimental de otros posibles usos terapéuticos de los antagonistas opioides.

Amenorrea por ejercicio

Se sabe que el sistema opioide tiene un efecto regulador de la actividad del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal. Gran parte de dicha regulación depende del tipo de receptor

activado. Por ejemplo, la administración de morfina por vía intracerebroventricular induce la activación del eje, incrementando los niveles de hormonas tales como la corticosterona. Sin embargo, la endomorfina tipos 1 y 2 (EM-1 y EM-2) no genera dichos cambios, a pesar de ser un agonista de los receptores μ [55, 56]. Curiosamente, la administración de antagonistas opiáceos inespecíficos, genera activación de dicho eje, con la consecuente liberación de hormonas tanto hipotalámicas como hipofisarias [57, 58]. Por tanto, en términos generales, se considera que el sistema opioide es un regulador negativo de la respuesta del eje, por ejemplo frente a condiciones estresantes [59]. El papel de los antagonistas opiáceos sobre la actividad de las hormonas sexuales se ha evaluado tanto en estudios clínicos como en modelos animales. La administración aguda de naloxona incrementa los niveles de hormona luteinizante (LH, por sus siglas en inglés) y testosterona, plasmáticos de manera de dosis dependiente; mientras los niveles de hormona folículo estimulante (FSH, por sus siglas en inglés) no son modificados en modelos animales [60]. Estudios clínicos confirman que efectivamente los niveles de LH son incrementados frente a la administración aguda de naloxona en sujetos sanos [61]. Aparentemente, dichos efectos son independientes de la acción de la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH, por sus siglas en inglés) sobre la adenohipófisis [62], lo cual indica una modulación directa del sistema opioide sobre la liberación de LH. La amenorrea, así como la menarquía tardía que se presenta en atletas de alto rendimiento, pueden ser explicadas por varios factores, entre los que se encuentran los cambios nutricionales, factores psicológicos relacionados con el estrés, disfunción hipotalámica y, finalmente, un incremento en la actividad del sistema opioide [63, 64]; todos estos factores en conjunto afectan la liberación de LH, así como de estrógenos y de GnRH. Por lo cual, resulta lógico pensar que el antagonismo del sistema opioide podría incrementar la liberación de gonadotrofinas, y por tanto, tener un papel en el tratamiento de la amenorrea inducida por ejercicio. Sin embargo, estudios clínicos indican que el bloqueo de opioides por medio de naloxona no modifica los niveles de gonadotrofinas ni prolactina en este grupo de pacientes en comparación con atletas eumenorreicos [65] ni tampoco al compararlo con controles [66]. Así, el uso de antagonistas tales como naltrexona para el manejo de la amenorrea inducida por ejercicio o de otros trastornos ginecológicos, puede involucrar otros grupos de hormonas como la ACTH y cortisol [67], o involucrar mecanismos metabólicos [68] que restablecen el ciclo menstrual normal.

Disquinesia

Dado que el sistema opioide participa activamente en la regulación del circuito dopaminérgico mesolímbico de recompensa [69], y que la activación de los receptores opioides (p. ej., μ y δ) incrementan los niveles de dopamina en el núcleo accumbens [70], no resulta improbable que el sistema opioide pueda ser un blanco terapéutico

para pacientes con enfermedad de Parkinson. Estudios mediante imágenes funcionales en humanos [71], así como en modelos animales [72], indican una desregulación del sistema opioide en la enfermedad de Parkinson (EP), así como mecanismos compensatorios generados por dicho sistema en los ganglios basales que pueden explicar parte de la fisiopatología de la enfermedad [73]. No hay evidencia del uso de antagonistas opioides para el manejo de la EP; sin embargo, en el caso de la disquinesia inducida por levodopa [74], estudios en primates indican una mejoría clínica con el uso de antagonistas específicos para μ (cyprodime) y δ (naltrindole), sin afectar los efectos antiparkinsonianos de la misma levodopa [75], lo cual podría tener utilidad clínica para el manejo de las reacciones adversas de pacientes tratados con levodopa a largo plazo. Desafortunadamente, el uso de antagonistas inespecíficos (naloxona y naltrexona) para el manejo de la disquinesia inducida por levodopa no ha presentado utilidad clínica en humanos [76]. Nuevamente, estudios en macacos indican que los antagonistas específicos para μ (ADL5510) son candidatos excelentes como antidisquinéticos en pacientes con EP tratados crónicamente con levodopa [77]; sin embargo, hasta el momento no hay evidencia clínica que apoye su uso.

Epilepsia

Múltiples estudios indican que el sistema opioide participa en la fisiopatología de la epilepsia, y de ese mismo modo puede ser un blanco terapéutico susceptible de modulación [78, 79]. Paradójicamente, la administración de agonistas opioides (p. ej., morfina) ha mostrado efectos tanto proconvulsivantes como anticonvulsionantes dependiendo de la vía de administración [80] y del nivel de neurodesarrollo de los sujetos [81]. Dicho efecto es, en parte, explicado por sus efectos sobre los receptores μ y κ , y el sistema GABAérgico. Estudios electrofisiológicos *in vitro* indican que la activación de los receptores κ aumentan la excitabilidad de las células del giro dentado del hipocampo [82], y de hecho, se ha descrito un incremento de la inmunorreactividad de dinorfina en las recurrentes excitatorias del hipocampo en sujetos con epilepsia del lóbulo temporal tras su estudio histopatológico [83]. De esta manera, la modulación de dicho receptor puede ser blanco farmacológico frente a crisis epilépticas, cuyo foco se localiza en dicha estructura. Se ha descrito, igualmente, que los modelos animales de inducción de convulsiones mediante ácido kaínico, la modulación ya sea del receptor κ [84] o del receptor ORL (nociceptina/orfanina) [85], puede tener repercusiones sobre la neurodegeneración inducida por dichos modelos de epilepsia. Por lo anteriormente expresado, el antagonismo de dichos receptores puede tener efectos antiepilépticos. De hecho, se ha descrito que los antagonistas opiáceos inespecíficos tienen efectos anticonvulsionantes en múltiples modelos animales [86], aunque también pueden revertir los efectos anticonvulsionantes en otros modelos experimentales [87, 88]. Teniendo

en cuenta el papel de los receptores opioides durante y después de una crisis epiléptica [89], otro de los posibles usos de los antagonistas opioides es, precisamente, el manejo del estado postictal [90]. Estudios experimentales resaltan el papel de los antagonistas específicos de los receptores μ (CTAP), así como el uso de los antagonistas inespecíficos para reducir el estado postictal [91, 92]. Por lo cual, los efectos tanto del sistema opioide como de sus antagonistas han mostrado resultados paradójicos en cuanto a su papel terapéutico en la epilepsia; por tanto, se considera que se deben realizar más estudios sobre el papel del sistema opioide endógeno en la fisiopatología de la epilepsia y de las crisis convulsivas en general.

Enfermedad de Alzheimer

El sistema opioide se encuentra expresado en estructuras que participan en el procesamiento cognitivo como el sistema límbico [93, 94]. Dentro de dicho sistema, el hipocampo es una estructura que es susceptible de lesión en enfermedades neurodegenerativas tan comunes como la enfermedad de Alzheimer (EA) [95] y explica gran parte de la sintomatología de dichos pacientes. Diferentes estudios indican que el sistema opioide se encuentra alterado en algunas enfermedades neurodegenerativas como la EA [96, 97] y que, además, este sistema puede estar involucrado en la fisiopatología de dicha demencia [98]. A pesar de la gran cantidad de evidencia experimental, no es claro si dichos cambios en el sistema opioide forman parte de la cascada que induce el déficit cognitivo o si es un mecanismo compensatorio frente a la neurodegeneración. En este sentido, gran parte de la evidencia indica que la activación del sistema opioide endógeno puede explicar parte del déficit cognitivo. Se ha reportado una sobreexpresión de los niveles de encefalina en el hipocampo de animales transgénicos que producen grandes cantidades de proteína humana PPA (proteína precursora del amiloide) [97, 99]. Por otro lado, en un interesante estudio de Meilandt *et al.* [100], se ha encontrado que dicha sobreexpresión de encefalina se presenta en tejido cerebral humano de pacientes con EA, y que la expresión de precursores opioides (preproencefalina), así como de met-enkefalina se relacionan con las alteraciones cognitivas y comportamentales en animales transgénicos como modelo de EA. Dicha afirmación se basa en que el uso del antagonista para los receptores μ (β -funaltrexamina) puede revertir dichos efectos [100]. Asimismo, se ha planteado que los antagonistas κ pueden prevenir la neurodegeneración [101]; sin embargo, estudios clásicos con naltrexona en sujetos con alzhéimer [102, 103] no han revelado una mejoría clínica significativa. Por último, el antagonista altamente selectivo de receptores opioides tipo δ (naltridona), atenúa el déficit cognitivo en modelos murinos de EA [104]. Evidencia reciente, indica que fármacos con actividad selectiva para diferentes tipos de neurotransmisores serán utilizados para atenuar el déficit cognitivo de los pacientes con alzhéimer en fases tempranas

[105, 106], así como en déficit cognitivo leve, el cual se considera un estado previo al desarrollo de la enfermedad. Sin embargo, gran parte de dichos estudios son ensayos clínicos en fases preliminares y se requieren estudios con una población mucho mayor.

Dolor

Dentro de los sistemas de modulación del dolor, se han descrito diferentes estructuras del sistema nervioso central que participan activamente en dicho proceso: amígdala, corteza cingulada rostral anterior, sustancia gris periacueductal, locus ceruleus y médula rostral ventral, entre otros [107]. La mayoría de las neuronas que conforman dichas estructuras, son productoras de opioides endógenos e, igualmente, expresan receptores opioides [108, 109]. Una de las estructuras más estudiadas en cuanto al procesamiento modulador descendente del dolor es la sustancia gris periacueductal; estudios clásicos indican que los efectos antinociceptivos de la estimulación eléctrica de dicha región pueden ser revertidos por naloxona [110], lo cual indica que la activación del sistema opioide endógeno es necesaria para la modulación descendente del dolor, aunque no es el único sistema de neurotransmisión implicado. De esta manera, los agonistas opiáceos han sido utilizados ampliamente para el manejo de diferentes tipos de dolor [111, 112]; sin embargo, debido a los efectos adversos reportados con su uso crónico [113, 114], así como los fenómenos de tolerancia [115, 116] y dependencia [117-119], revelan que su uso es limitado y, por tanto, tienen unas indicaciones terapéuticas específicas. Curiosamente, se ha reportado un fenómeno poco comprendido, denominado hiperalgesia inducida por opiáceos [117, 120, 121], donde paradójicamente la administración de agonistas opioides puede incrementar la sensibilidad al dolor o reducir su umbral. Dicho fenómeno puede ser revertido mediante dosis ultrabajas de naloxona en modelos murinos [122]. Por otro lado, estudios clínicos indican que los antagonistas opiáceos en bajas dosis (p. ej., naltrexona) pueden aumentar la eficacia analgésica de algunos agonistas opiáceos como la oxycodona y la metadona, además de reducir la tolerancia y dependencia de estos analgésicos [123-125]. Dicha indicación terapéutica es algo paradójica, así como contraintuitiva; teniendo en cuenta que estos antagonistas pueden competir, así como desplazar el efecto de los agonistas de receptores opiáceos. Los agonistas opiáceos tienen un efecto inicialmente inhibitorio; sin embargo, con su uso crónico los efectos sobre los receptores se vuelven excitatorios [126], posiblemente debido a una alteración en el acople con las proteínas G y con la adenilato ciclasa [124, 127]. De esta manera, el uso combinado de agonista/antagonista puede reducir dicha conversión y así limitar los efectos adversos. Finalmente, hay evidencia tanto clínica como experimental de que los antagonistas opiáceos pueden ser utilizados en monoterapia para el tratamiento de diferentes tipos de dolor crónico [46, 128, 129], así como en combinación con metadona para el manejo del dolor neuropático [123]. Estudios

en modelos animales, indican que el uso de antagonistas opioides a bajas dosis genera una sobrerregulación (*up-regulation*) de los receptores μ en regiones cerebrales que participan en el procesamiento del dolor [130, 131], y además incrementan la expresión de opioides endógenos tales como la beta-endorfina [46, 132]. Por lo cual, el uso de antagonistas opioides puede tener una utilidad terapéutica para reducir efectos adversos de los opiáceos (hiperalgesia inducida por opiáceos), potenciar los efectos analgésicos de los agonistas opiáceos y, finalmente, a bajas dosis puede tener un efecto analgésico importante *per se*.

Potenciación cognitiva

Como se ha mencionado anteriormente, el sistema opioide participa en diferentes funciones cognitivas superiores tales como la memoria y el aprendizaje [133, 134]. De hecho, las estructuras cerebrales encargadas del procesamiento de la memoria están compuestas por neuronas que sintetizan opioides endógenos, expresan sus receptores y además modifican su plasticidad sináptica de acuerdo con una activación diferencial de dichos receptores [93, 94, 135, 136]. Estudios clásicos con animales de experimentación han reportado un incremento en la ejecución de tareas de memoria tras la administración tanto central como periférica de antagonistas opiáceos [137, 138]. Al parecer, la inactivación del sistema opioide facilita la activación del sistema noradrenérgico central por el complejo amigdalino, y dicha activación incrementa el procesamiento cognitivo [139, 140]. Además, los antagonistas opioides pueden incrementar la actividad sináptica del hipocampo directamente. Estudios *in vitro* indican que la administración de naloxona prolonga la potenciación a largo plazo (*long term potentiation*-LTP) de la colateral de Schaffer a CA1 [141], cambios a su vez asociados con un incremento en la ejecución de la memoria espacial. Acorde con los anteriores resultados, diferentes estudios indican que la administración de los agonistas opioides tiene efectos amnésicos [142, 143] y, por tanto, soporta el papel de potenciador cognitivo de los antagonistas. Sin embargo, algunos estudios indican que en el caso de la memoria espacial los antagonistas pueden mejorar [141, 144] o deteriorar [145] la ejecución de dicho tipo de memoria, dependiendo de la especificidad y la reversibilidad de dichos antagonistas. Estudios en primates han reportado un patrón en *U invertida* para los efectos de la naloxona, donde bajas dosis tienen pocos efectos, dosis intermedias mejoran y dosis altas deterioran las tareas de memoria de reconocimiento visual [146]. Estudios clínicos indican que dichos efectos duales pueden ser dependientes del grado de activación emocional, y por tanto, la naltrexona puede desplazar dicha curva de U invertida descrita anteriormente [147]. De esta manera, el efecto de los antagonistas sobre el procesamiento de la memoria tiene efectos variados dependiendo de la dosis, del estado emocional de los sujetos y del grado de especificidad y reversibilidad del antagonista.

Trastornos psiquiátricos y del comportamiento

Existe una gran diversidad de trastornos psiquiátricos que tienen componentes afectivos y emocionales que involucran el sistema opioide [148, 149]. Dentro de dichas patologías se encuentran los trastornos alimentarios, y, precisamente, el que más se ha estudiado en relación con el sistema opioide es el trastorno por atracón (*binge eating disorder*) [150]. Se ha descrito que el principal receptor opioide involucrado en este trastorno es el receptor μ , el cual se ha visto que participa en la mediación de respuestas hedónicas [151, 152]. Los primeros estudios que demostraron el efecto de los antagonistas opioides en la respuesta a la ingesta de alimentos, datan desde 1986, donde se demostró que incluso en poblaciones de sujetos sanos, los sujetos que recibían naltrexona preferían concentraciones más bajas de azúcar en comparación con los sujetos que recibían placebo [153]. De igual manera, estudios en pacientes bulímicos demostraron una disminución en la cantidad de comida ingerida y del tiempo del episodio de atracón, después de la administración durante seis semanas de naltrexona [154]. En una paciente con trastorno alimentario de atracón con dosis de 100 mg de naltrexona al día se reportó mejoría en 14 días de tratamiento [155]. Se han descrito mejorías del 5% hasta al 10% de reducción de peso en pacientes obesos en manejo dietario, asociado a bupropión (360 mg/día) junto con naltrexona (32 mg/día) [156]. Recientemente, se utilizó un antagonista específico para μ (GSK1521498) en el tratamiento del trastorno por atracón, donde se evidenció una disminución significativa de los episodios de atracón y de la ingesta de comida a comparación del placebo, sin ningún efecto adverso sobre la memoria o la cognición [157].

Por otro lado, dado el poco margen terapéutico para el manejo farmacológico de los trastornos del espectro autista [158], los antagonistas opioides se convierten en una buena opción. Estudios en animales han demostrado que las relaciones sociales, en parte, podrían estar mediadas por neurotransmisores como la serotonina, la melatonina y los opioides [157]. Basados en dichos modelos, se ha planteado la hipótesis de que el autismo pudiera ser consecuencia de una actividad excesiva opioide durante el período neonatal [159]. Asimismo, se han reportado niveles elevados tanto en plasma como en líquido cefalorraquídeo de péptidos opioides, que contribuyen aún más a la hipótesis de la sobreactivación del sistema opioide en el autismo [86]. De esta manera, se ha utilizado la naltrexona en dosis de 0,5 hasta 2 mg/kg/día, en el tratamiento del autismo y se ha visto que es especialmente eficaz en la disminución en comportamientos de autolesión [160].

Teniendo en cuenta la importancia del papel del sistema opioide endógeno en muchas funciones cognitivas, se cree que una función aberrante de este, podría ser un factor etiológico importante en el desarrollo de indiferencia social, y la incapacidad de gene-

rar enlaces sociales estables, como en el caso del trastorno de la personalidad límite [161]. Dicha afirmación es respaldada por el hecho de que la mayoría de los pacientes con este trastorno, tienden a usar sustancias cuyas dianas son los receptores μ [162] y, además, presentan variantes genéticas del receptor D2 de dopamina [163], lo que en consecuencia genera mayor riesgo de dependencia y de abuso de opioides en tales pacientes [164]. Algunos síntomas disociativos en pacientes con trastorno de personalidad límite y con despersonalización crónica, pueden ser manejados con antagonistas opioides tipo naltrexona y naloxona [165, 166]. Además, la naltrexona ha sido utilizada en el manejo sintomático de pacientes con trastorno obsesivo compulsivo [167, 168], en sujetos con conductas autolesivas [169] y como coadyuvante del trastorno por estrés postraumático [43, 170].

Finalmente, dada la participación del sistema opioide en la regulación del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal y de su expresión en estructuras del sistema límbico, el uso de antagonistas opioides puede ser utilizado como regulador de los efectos cognitivos del estrés [105], el cual, a su vez, está relacionado con el desarrollo de múltiples trastornos psiquiátricos y del comportamiento.

Utilidad de los antagonistas opiáceos en dependencia por etanol y opioides

El alcohol induce la liberación de opioides endógenos en los sistemas de recompensa (el tegmento ventral y núcleo accumbens), facilita la neurotransmisión dopaminérgica y controla los efectos eufóricos y placenteros del etanol. En 1994, la Food and Drug Administration (FDA) aprobó naltrexona para el tratamiento de la dependencia a etanol, con el objetivo de reducir el riesgo de recaídas, mantener la abstinencia y reducir el deseo por el consumo durante las fases iniciales de la recuperación. Una revisión sistemática de Cochrane apoya la eficacia del uso de naltrexona, ya que se asocia con la disminución en la cantidad y frecuencia de consumo, un mayor número de días de abstinencia de consumo y mayor número de días de consumo pesado frente a placebo [171].

A pesar de la evidencia a favor de su efectividad, el uso clínico de la naltrexona ha estado limitado por la heterogeneidad en la respuesta al tratamiento, influenciada, entre otros factores, por el grado de motivación del paciente por el abandono del consumo y por la pobre adherencia a la terapia en el esquema de administración diaria. Para mejorar la adherencia al tratamiento, se diseñó naltrexona en forma farmacéutica inyectable de larga acción para aplicación mensual, que demostró ser bien tolerada y efectiva después de seis meses de tratamiento en un ensayo clínico aleatorizado, doble ciego, controlado por placebo, publicado en *JAMA* en 2005. En este estudio, la naltrexona inyectable de larga acción disminuyó 25% la tasa de días de abstinencia frente al placebo ($P = 0,03$) y el sexo masculino mostró mayor efecto del tratamiento. La tasa de discontinuación del tratamiento fue similar en los sujetos que recibieron naltrexona y placebo [172].

Nalmefeno es otro antagonista opioide aprobado para el manejo de dependencia a etanol, con la ventaja que no exhibe hepatotoxicidad dependiente de dosis, como lo puede hacer la naltrexona, lo que aumenta su perfil de seguridad en pacientes con disfunción hepática alcohólica. El tratamiento con naltrexona administrada solo en situaciones de riesgo de consumo, ha mostrado ser más eficaz que la administración diaria, disminuyendo el número promedio de bebidas diarias, con mayor efecto en el género masculino, y mejorando las pruebas de función hepática en pacientes con enfermedad hepática asociada al consumo [173].

El tratamiento de la dependencia a opioides es otra indicación aprobada para el uso de antagonistas opioides. La exposición prolongada a los opioides genera hipersensibilización del sistema de recompensa del cerebro, de tal manera que el individuo puede experimentar un deseo patológico por consumir la sustancia (*craving*), independiente de la aparición de los síntomas de abstinencia. Antagonistas opioides, como la naltrexona, bloquean los efectos eufóricos de los opioides y de esta manera disminuyen el refuerzo positivo del consumo. Los antagonistas opioides no tienen potencial adictivo y no inducen la tolerancia. Al igual que en la dependencia a etanol, los estudios clínicos han demostrado que las formulaciones de liberación sostenida de la naltrexona son más eficaces que el placebo en términos de reducción del *craving* y reducción de consumo de opioides [174].

Estatus de desarrollo clínico de los antagonistas opioides en usos terapéuticos potenciales

A pesar de la evidencia preclínica experimental y pese al conocimiento cada vez más profundo de la fisiopatología de las entidades clínicas mencionadas anteriormente, no hay evidencia clínica del papel de la naloxona, o de la naltrexona en la enfermedad de Alzheimer, amenorrea, disquinesia o epilepsia [34]. Con respecto a esta última indicación, hay un estudio clínico de fase III en curso, dirigido a establecer la eficacia de la naloxona en disfunción respiratoria postictal en pacientes con crisis tónico-clónicas generalizadas (NCT02332447) [34].

La mayor evidencia clínica se encuentra con el uso de la naloxona y la naltrexona como coadyuvantes en diferentes tipos de dolor, generalmente en combinación con la oxycodona, en la que el uso de estos compuestos podría reducir las reacciones adversas derivadas del uso de agonistas opioides, y a la vez mejorar el efecto analgésico [34, 175]. Gran parte de la evidencia clínica para el uso de naltrexona en diferentes tipos de dolor está actualmente en estudio: dolor secundario a osteoartritis (NCT00420992); dolor regional complejo (NCT02502162), y fibromialgia (NCT00568555), entre otros [34]. Recientemente, la FDA aprobó una preparación de liberación extendida de

naloxona/oxycodona para dolor severo que requiere manejo de opioides por horario a largo plazo [176].

En un estudio aleatorizado, doble ciego, la naltrexona mostró seguridad y eficacia al reducir la actividad inflamatoria, así como una mejoría de los síntomas (principalmente dolor) en pacientes con enfermedad de Crohn [177]. Aunque dichos resultados han sido controversiales debido al tamaño de la muestra [47], un nuevo estudio se está realizando (NCT01810185) [34].

De igual manera, el efecto de la naltrexona en el control de impulsos de pacientes con enfermedad de Parkinson ha mostrado resultados prometedores. Sin embargo, se han controvertido los resultados basados en la aplicación de escalas, debido a la falta de eficacia en la respuesta clínica global de estos pacientes [178].

Además, se está desarrollando un estudio clínico de fase III para evaluar la eficacia de un espray nasal de naloxona para el manejo de pacientes con síndrome del atracón (*binge eating disorder*) (NCT01567670) [34].

Finalmente, no existe experiencia clínica para la combinación de ciprodimina/naltrindol [34].

CONCLUSIÓN

El sistema opioide tiene una amplia distribución en el sistema nervioso central y, por ende, participa en diferentes funciones nerviosas superiores. La interacción de los opioides endógenos con sus respectivos receptores modula la función celular de dichas regiones centrales. Asimismo, el sistema opioide participa en la fisiopatología de diferentes trastornos endocrinos, neuronales, inmunológicos y, finalmente, comportamentales. Los efectos de los fármacos antagonistas son evidentes en aquellos sistemas de neurotransmisión que están activos en condiciones basales y el sistema opioide forma parte de dichos sistemas de neurotransmisión; por este motivo, los antagonistas opioides pueden generar diferentes efectos fisiológicos en sujetos sanos. Sin embargo, el sistema opioide puede estar sobreactivado en diferentes trastornos, revisados anteriormente, y por tanto, su modulación mediante antagonistas podría tener utilidad terapéutica. De estos usos novedosos, el más importante es el del control de los efectos adversos y el favorecimiento de la analgesia por agonistas opioides, que ha dado lugar a la inclusión de esta combinación (agonista más antagonista opioide) en el arsenal terapéutico para el manejo del dolor. Finalmente, dados los efectos adversos y en algunos casos idiosincráticos de los antagonistas opioides inespecíficos, el uso de antagonistas específicos para los receptores opioides (μ , κ y δ), así como de los ORL, puede ser una estrategia

terapéutica futura. Es necesario realizar más estudios clínicos para determinar la eficacia, así como el perfil de seguridad de muchos de los antagonistas opioides que se encuentran en las fases experimentales en indicaciones tan variadas como la enfermedad de Parkinson, el síndrome del atracón y el manejo de dependencia por cocaína.

AGRADECIMIENTOS

A Jessica Méndez Garzón (q.e.p.d.), quien colaboró con la parte introductoria del presente artículo.

REFERENCIAS

1. Laux-Biehlmann, J. Mouheiche, J. Vérièpe, Y. Goumon, Endogenous morphine and its metabolites in mammals: History, synthesis, localization and perspectives, *Neuroscience*, **13**, 233 (2013).
2. A. Corbett, S. McKnight, G. Henderson, Opioids receptors. Advancing research for the life scientist. TOCRIS. URL: <http://www.tocris.com/pdfs/oprev.pdf>, octubre, 2014.
3. R.J. Bodnar, Endogenous opiates and behavior: 2012, *Peptides*, **38**, 2 (2013).
4. M.J. Brownstein, A brief history of opiates, opioid peptides, and opioid receptors, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 12 (1993).
5. M. Waldhoer, S.E. Bartlett, J.L. Whistler, Opioid receptors, *Ann. Rev. Biochem.*, **73**, 953-990 (2004).
6. A.M. Trescot, S. Datta, M. Lee, H. Hansen, Opioid pharmacology, *Pain Physician*, **11**, S133 (2008).
7. M.J. Christie, Cellular neuroadaptations to chronic opioids: Tolerance, withdrawal and addiction, *Br. J. Pharmacol.*, **154**, 2 (2008).
8. H.Y. Wang, E. Friedman, M.C. Olmstead, L.H. Burns, Ultra-low-dose naloxone suppresses opioid tolerance, dependence and associated changes in mu opioid receptor-G protein coupling and Gbetagamma signaling, *Neuroscience*, **135**, 1 (2005).
9. C. Harrison, D. Smart, D.G. Lambert, Stimulatory effects of opioids, *Br. J. Anaesth.*, **81**, 1 (1998).
10. K. Takahama, T. Shirasaki, Central and peripheral mechanisms of narcotic anti-tussives: Codeine-sensitive and -resistant coughs, *Cough*, **9**, 3 (2007).

11. M. Sobczak, M. Sałaga, M.A. Storr, J. Fichna, Physiology, signaling, and pharmacology of opioid receptors and their ligands in the gastrointestinal tract: Current concepts and future perspectives, *J. Gastroenterol.*, **49**, 1 (2014).
12. R. Labianca, P. Sarzi-Puttini, S.M. Zuccaro, P. Cherubino, R. Vellucci, D. Fornasari, Adverse effects associated with non-opioid and opioid treatment in patients with chronic pain, *Clin. Drug Investig.*, **32**, 53 (2012).
13. S. Mercadante, E. Arcuri, Opioids and renal function, *J. Pain*, **5**, 1 (2004).
14. N.A. Francisco, Control of breathing: How to better understand the respiratory effects of opioids, *Eur. J. Pain Suppl.*, **5**, 1 (2004).
15. M.K. Pugsley, The opioid receptor independent actions of kappa receptor agonists in the cardiovascular system, *Curr. Pharm. Des.*, **10**, 20 (2004).
16. T.B. Strouse, Pharmacokinetic drug interactions in palliative care: Focus on opioids, *Palliat. Med.*, **12**, 11 (2009).
17. T.L. Yaksh, M.S. Wallance, "Goodman & Gilman's. The pharmacological basis of therapeutics", Ed. L. Brunton, B. Chabner, B. Knollman, McGraw-Hill, San Diego, 2012.
18. P.S. Portoghese, R. el Kouhen, P.Y. Law, H.H. Loh, B. Le Bourdonnec, Affinity labels as tools for the identification of opioid receptor recognition sites, *Farmaco*, **56**, 3 (2001).
19. V. Barnett, R. Twycross, M. Mihalyo, A. Wilcock, Opioid antagonists, *J. Pain Symptom. Manag.*, **47**, 2 (2014).
20. M. Urbano, M. Guerrero, H. Rosen, E. Roberts, Antagonists of the kappa opioid receptor, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **1**, 24 (2014).
21. W.D. Chey, L. Webster, M. Sostek, J. Lappalainen, P.N. Barker, J. Tack, Naloxegol for opioid-induced constipation in patients with noncancer pain, *N. Engl. J. Med.*, **370**, 25 (2014).
22. G. Becker, H.E. Blum, Novel opioid antagonists for opioid-induced bowel dysfunction and postoperative ileus, *Lancet*, **373**, 9670 (2009).
23. G. Becker, D. Galandi, H.E. Blum. Peripherally acting opioid antagonists in the treatment of opiate-related constipation: A systematic review, *J. Pain Symptom. Manag.*, **34**, 5 (2007).

24. Clinical Key. Agents, nalmefene, drug monograph. URL: [https://www.clinicalkey.com.ezproxy.unisabana.edu.co/#!/ContentPlayerCtrl/doPlayContent/6-s2.0-424/{%22scope%22:%22all%22,%22query%22:%22nalmefene%22}](https://www.clinicalkey.com.ezproxy.unisabana.edu.co/#!/ContentPlayerCtrl/doPlayContent/6-s2.0-424/{%22scope%22:%22all%22,%22query%22:%22nalmefene%22},), accesado en octubre, 2014.
25. K. Bui, F. She, M. Sostek, The effects of renal impairment on the pharmacokinetics, safety, and tolerability of naloxegol, *J. Clin. Pharmacol.*, **54**, 1375 (2014).
26. X. Dai, H.J. Song, S.G. Cui, T. Wang, Q. Liu Q, R. Wang, The stimulative effects of endogenous opioids on endothelial cell proliferation, migration and angiogenesis in vitro, *Eur. J. Pharmacol.*, **628**, 42 (2010).
27. J.L. Martin, L. Koodie, A.G. Krishnan, R. Charboneau, R.A. Barke, S. Roy, Chronic morphine administration delays wound healing by inhibiting immune cell recruitment to the wound site, *Am. J. Pathol.*, **176**, 2 (2010).
28. N. El-Hage, S.M. Dever, E.M. Podhaizer, C.K. Arnatt, Y. Zhang, K.F. Hauser. A novel bivalent HIV-1 entry inhibitor reveals fundamental differences in CCR5- μ -opioid receptor interactions between human astroglia and microglia, *AIDS*, **27**, 14 (2013).
29. C.S. Wong, The mechanisms of ultra-low dose opioid agonist-antagonist, *J. Formos. Med. Assoc.*, **110**, 10 (2011).
30. S.L. Lin, R.Y. Tsai, C.H. Shen, F.H. Lin, J.J. Wang, S.T. Hsin, C.S. Wong, Co-administration of ultra-low dose naloxone attenuates morphine tolerance in rats via attenuation of NMDA receptor neurotransmission and suppression of neuroinflammation in the spinal cords, *Pharmacol. Biochem. Behav.*, **96**, 236 (2010).
31. M.R. Hutchinson, Y. Zhang, M. Shridhar, J.H. Evans, M.M. Buchanan, T.X. Zhao, P.F. Slivka, B.D. Coats, N. Rezvani, J. Wieseler, T.S. Hughes, K.E. Landgraf, S. Chan, S. Fong, S. Phipps, J.J. Falke, L.A. Leinwand, S.F. Maier, H. Yin, K.C. Rice, L.R. Watkins, Evidence that opioids may have toll-like receptor 4 and MD-2 effects. *Brain Behav. Immun.*, **24**, 1 (2010).
32. S.L. Lin, R.Y. Tsai, Y.H. Tai, C.H. Cherng, C.T. Wu, C.C. Yeh, C.S. Wong, Ultra-low dose naloxone upregulates interleukin-10 expression and suppresses neuroinflammation in morphine-tolerant rat spinal cords, *Behav. Brain Res.*, **207**, 1 (2010).
33. W.C. Jan, C.H. Chen, K. Hsu, P.S. Tsai, C.J. Huang, L-type calcium channels and μ -opioid receptors are involved in mediating the anti-inflammatory effects of naloxone, *J. Surg. Res.*, **167**, 2 (2011).

34. RTI International, National Institute on Drug Abuse (NIDA). Clinicaltrials.gov. URL: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01431586?term=jdtic&rank=1>, accesado en octubre, 2014.
35. L.G. Maxwell, S.C. Kaufmann, S. Bitzer, E.V. Jr Jackson, J. McGready, S. Kost-Byerly, L. Kozlowski, S.K. Rothman, M. Yaster, The effects of a small-dose naloxone infusion on opioid-induced side effects and analgesia in children and adolescents treated with intravenous patient-controlled analgesia: A double-blind, prospective, randomized, controlled study, *Anesth. Analg.*, **100**, 4 (2005).
36. S. Okie, A flood of opioids, a rising tide of deaths, *N. Engl. J. Med.*, **363**, 21 (2010).
37. L.J. Paulozzi, D.S. Budnitz, Y. Xi, Increasing deaths from opioid analgesics in the United States, *Pharmacoepidemiol. Drug Saf.*, **15**, 9 (2006).
38. E.W. Boyer, Management of opioid analgesic overdose, *N. Engl. J. Med.*, **367**, 2 (2012).
39. J. Prudic, L. Fitzsimons, M.S. Nobler, H.A. Sackeim, Naloxone in the prevention of the adverse cognitive effects of ECT: A within subject, placebo controlled study, *Neuropsychopharmacology*, **21**, 2 (1999).
40. P. Rapeli, C. Fabritius, H. Alho, M. Salaspuro, K. Wahlbeck, H. Kalska, Methadone vs. buprenorphine/naloxone during early opioid substitution treatment: A naturalistic comparison of cognitive performance relative to healthy controls, *BMC Clin. Pharmacol.*, **12**, 7 (2007).
41. R.D. Weiss, M.L. Griffin, J.S. Potter, D.R. Dodd, J.A. Dreifuss, H.S. Connery, K.M. Carroll, Who benefits from additional drug counseling among prescription opioid-dependent patients receiving buprenorphine-naloxone and standard medical management? *Drug Alcohol Depend.*, **1**, 140 (2014).
42. D.M. Hartung, D. McCarty, R. Fu, K. Wiest, M. Chalk, D.R. Gastfriend, Extended-release naltrexone for alcohol and opioid dependence: A meta-analysis of healthcare utilization studies, *J. Subst. Abuse Treat.*, **47**, 2 (2014).
43. I.L. Petrakis, J. Poling, C. Levinson, C. Nich, K. Carroll, E. Ralevski, B. Rounsaville, Naltrexone and disulfiram in patients with alcohol dependence and comorbid post-traumatic stress disorder, *Biol. Psychiatry*, **1**, 60 (2006).
44. I.L. Petrakis, E. Ralevski, N. Desai, L. Trevisan, R. Gueorguieva, B. Rounsaville, J.H. Krystal, Noradrenergic vs. serotonergic antidepressant with or without nal-

- trexone for veterans with PTSD and comorbid alcohol dependence, *Neuropsychopharmacology*, **37**, 996 (2012).
45. A. Garg, P. Sinha, P. Kumar, O. Prakash, Use of naltrexone in ketamine dependence, *Addict. Behav.*, **39**, 8 (2014).
46. J.P. Smith, H. Stock, S. Bingaman, D. Mauger, M. Rogosnitzky, I.S. Zagon, Low-dose naltrexone therapy improves active Crohn's disease, *Am. J. Gastroenterol.*, **102**, 820 (2007).
47. D. Segal, J.K. Macdonald, N. Chande, Low dose naltrexone for induction of remission in Crohn's disease, *Cochrane Database Syst. Rev.*, **21**, 2 (2014).
48. J. Younger, N. Noor, R. McCue, S. Mackey, Low-dose naltrexone for the treatment of fibromyalgia: Findings of a small, randomized, double-blind, placebo-controlled, counterbalanced, crossover trial assessing daily pain levels, *Arthritis Rheum.*, **65**, 529 (2013).
49. M. Gironi, F. Martinelli-Boneschi, P. Sacerdote, C. Solaro, M. Zaffaroni, R. Cavarretta, L. Moiola, S. Bucello, M. Radaelli, V. Pilato, M. Rodegher, M. Cursi, S. Franchi, V. Martinelli, R. Nemni, G. Comi, G. Martino, A pilot trial of low-dose naltrexone in primary progressive multiple sclerosis, *Mult. Scler.*, **14**, 8 (2008).
50. B.A. Cree, E. Kornyeveva, D.S. Goodin, Pilot trial of low-dose naltrexone and quality of life in multiple sclerosis, *Ann. Neurol.*, **68**, 2 (2010).
51. T. Frech, K. Novak, M.P. Revelo, M. Murtaugh, B. Markewitz, N. Hatton, M.B. Scholand, E. Frech, D. Markewitz, A.D. Sawitzke, Low-dose naltrexone for pruritus in systemic sclerosis, *Int. J. Rheumatol.*, **2011**, Epub, Sep. 12 (2011).
52. B. Bihari, Low-dose naltrexone for normalizing immune system function, *Altern. Ther. Health Med.*, **19**, 2 (2013).
53. J. Younger, L. Parkitny, D. McLain, The use of low-dose naltrexone (LDN) as a novel anti-inflammatory treatment for chronic pain, *Clin. Rheumatol.*, **33**, 4 (2014).
54. M.O. Nava-Mesa, R. López, Efectos del sistema opioide sobre el procesamiento de la memoria. Evidencia clínica y experimental, *Rev. Colomb. Med. Fís. Rehabil.*, **19**, 55 (2009).
55. T.L. Coventry, D.S. Jessop, D.P. Finn, M.D. Crabb, H. Kinoshita, M.S. Harbuz, Endomorphins and activation of the hypothalamo-pituitary-adrenal axis, *J. Endocrinol.*, **169**, 185 (2001).

56. J.E. Zadina, L. Hackler, L.J. Ge, A.J. Kastin, A potent and selective endogenous agonist for the mu-opiate receptor, *Nature*, **3**, 386 (1997).
57. G.A. Carrasco, L.D. Van de Kar, Neuroendocrine pharmacology of stress, *Eur. J. Pharmacol.*, **463**, 235 (2003).
58. R.J. Bodnar, Endogenous opiates and behavior: 2011, *Peptides*, **38**, 463 (2012).
59. P.J. Brunton, S.L. Meddlem, S. Ma, T. Ochedalski, A.J. Douglas, J.A. Russell, Endogenous opioids and attenuated hypothalamic-pituitary-adrenal axis responses to immune challenge in pregnant rats, *J. Neurosci.*, **25**, 5117 (2005).
60. B. Singh, V. Dixit, P. Singh, G. Georgie, V. Dixit, Effect of naloxone on the plasma levels of LH, FSH, prolactin and testosterone in Beetal bucks, *Small Rumin. Res.*, **37**, 51 (2000).
61. C.A. Villanueva-Díaz, R. Pineda-Viedas, M.G. Echavarría-Sánchez, A. Juárez-Bengoa, Change of pulsatile release and luteinizing hormone response to naloxone related to testicle damage, *Ginecol. Obstet. Mex.*, **75**, 200 (2007).
62. P. Palta, T. Chandrasekhar, B.S. Prakash, M.L. Madan, Effect of naloxone on GnRH-induced LH and FSH release in buffalo, *Bubalus bubalis*, *Indian J. Exp. Biol.*, **38**, 390 (2000).
63. J. Buvat, M. Buvat-Herbaut, Ovulation disturbances in athletes and their mechanisms, *J. Gynecol. Obstet. Biol. Reprod. (Paris)*, **20**, 899 (1991).
64. M.P. Warren, N.E. Perlroth, The effects of intense exercise on the female reproductive system, *J. Endocrinol.*, **170**, 3 (2001).
65. M.H. Samuels, C.F. Sanborn, F. Hofeldt, R. Robbins, The role of endogenous opiates in athletic amenorrhea, *Fertil. Steril.*, **55**, 507 (1991).
66. G. Dixon, P. Eurman, B.E. Stern, B. Schwartz, R.W. Rebar, Hypothalamic function in amenorrheic runners, *Fertil. Steril.*, **42**, 377 (1984).
67. G. Botticelli, A. Bacchi- Modena, D. Bresciani, P. Villa, L. Aguzzoli, P. Florio, R.E. Nappi, F. Petraglia, A.R. Genazzani, Effect of naltrexone treatment on the treadmill exercise-induced hormone release in amenorrheic women, *J. Endocrinol. Invest.*, **15**, 839 (1992).
68. F. Fruzzetti, C. Bersi, D. Parrini, C. Ricci, A.R. Genazzani, Effect of long-term naltrexone treatment on endocrine profile, clinical features, and insulin sensi-

- tivity in obese women with polycystic ovary syndrome, *Fertil. Steril.*, **77**, 936 (2002).
69. J.D. Belluzzi, L. Stein, Enkephalin may mediate euphoria and drive-reduction reward, *Nature*, **266**, 556 (1977).
70. C. Gianoulakis, Endogenous opioids and addiction to alcohol and other drugs of abuse, *Curr. Top. Med. Chem.*, **9**, 999 (2009).
71. P. Piccini, R.A. Weeks, D.J. Brooks, Alterations in opioid receptor binding in Parkinson's disease patients with levodopa-induced dyskinesias, *Ann. Neurol.*, **42**, 720 (1997).
72. H. Koizumi, R. Morigaki, S. Okita, S. Nagahiro, R. Kaji, M. Nakagawa, S. Goto, Response of striosomal opioid signaling to dopamine depletion in 6-hydroxydopamine-lesioned rat model of Parkinson's disease: A potential compensatory role, *Front. Cell. Neurosci.*, **7**, 74 (2013).
73. G.B. Stefano, K.J. Mantione, M. Králíčková, R. Ptacek, H. Kuzelova, T. Esch, R.M. Kream, Parkinson's disease, L-DOPA, and endogenous morphine: A revisit, *Med. Sci. Monit.*, **18**, RA133 (2012).
74. G. Fabbrini, J.M. Brotchie, F. Grandas, M. Nomoto, C.G. Goetz, Levodopa-induced dyskinesias, *Mov. Disord.*, **22**, 1379 (2007).
75. B. Henry, S.H. Fox, A.R. Crossman, J.M. Brotchie, Mu- and delta-opioid receptor antagonists reduce levodopa-induced dyskinesia in the MPTP-lesioned primate model of Parkinson's disease, *Exp. Neurol.*, **171**, 139 (2001).
76. S.H. Fox, A.E. Lang, J.M. Brotchie, Translation of nondopaminergic treatments for levodopa-induced dyskinesia from MPTP-lesioned nonhuman primates to phase IIa clinical studies: Keys to success and roads to failure, *Mov. Disord.*, **21**, 1578 (2006).
77. J.B. Koprich, S.H. Fox, T.H. Johnston, A. Goodman, B. Le Bourdonnec, R.E. Dolle, R.N. DeHaven, D.L. DeHaven-Hudkins, P.J. Little, J.M. Brotchie, The selective mu-opioid receptor antagonist ADL5510 reduces levodopa-induced dyskinesia without affecting antiparkinsonian action in MPTP-lesioned macaque model of Parkinson's disease, *Mov. Disord.*, **26**, 1225 (2011).
78. F.C. Tortella, Endogenous opioid peptides and epilepsy: Quieting the seizing brain?, *Trends Pharmacol. Sci.*, **9**, 366 (1988).

79. K. Ramabadran, M. Bansinath, Endogenous opioid peptides and epilepsy, *Int. J. Clin. Pharmacol. Ther. Toxicol.*, **28**, 47 (1990).
80. H. Frenk, Pro- and anticonvulsant actions of morphine and the endogenous opioids: Involvement and interactions of multiple opiate and non-opiate systems, *Brain Res.*, **287**, 197 (1983).
81. H. Van Praag, M. Falcon, D. Guendelman, H. Frenk, The development of analgesic, pro- and anti-convulsant opiate effects in the rat, *Ann. Ist. Super. Sanita*, **29**, 419 (1993).
82. C.M. McDermott, L.A. Schrader, Activation of κ opioid receptors increases intrinsic excitability of dentate gyrus granule cells, *J. Physiol.*, **589**, 3517 (2011).
83. C.R. Houser, J.E. Miyashiro, B.E. Swartz, G.O. Walsh, J.R. Rich, A.V. Delgado-Escueta, Altered patterns of dynorphin immunoreactivity suggest mossy fiber reorganization in human hippocampal epilepsy, *J. Neurosci.*, **10**, 267 (1990).
84. E. Schunk, C. Aigner, N. Stefanova, G. Wenning, H. Herzog, C. Schwarzer, Kappa opioid receptor activation blocks progressive neurodegeneration after kainic acid injection, *Hippocampus*, **21**, 1010 (2011).
85. G. Armagan, E. Bojnik, E. Turunc, L. Kanit, O. Gündüz Çinar, S. Benyhe, A. Borsodi, A. Yalcin, Kainic acid-induced changes in the opioid/nociceptin system and the stress/toxicity pathways in the rat hippocampus, *Neurochem. Int.*, **60**, 555 (2012).
86. M.S. Nandhu, G. Naijil, S. Smijin, S. Jayanarayanan, C.S. Paulose, Opioid system functional regulation in neurological disease management, *J. Neurosci. Res.*, **88**, 3215 (2010).
87. H. Homayoun, S. Khavandgar, A.R. Dehpour, The involvement of endogenous opioids and nitricoxidergic pathway in the anticonvulsant effects of foot-shock stress in mice, *Epilepsy Res.*, **49**, 131 (2002).
88. S. Caldecott-Hazard, Y. Shavit, R.F. Ackermann, J. Engel, R.C. Frederickson, J.C. Liebeskind, Behavioral and electrographic effects of opioids on kindled seizures in rats, *Brain Res.*, **251**, 327 (1982).
89. P.A. Bartenstein, J.S. Duncan, M.C. Prevett, V.J. Cunningham, D.R. Fish, A.K. Jones, S.K. Luthra, G.V. Sawle, D.J. Brooks, Investigation of the opioid system in absence seizures with positron emission tomography, *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*, **56**, 1295 (1993).

90. R.S. Fisher, S.C. Schachter, The postictal state: A neglected entity in the management of epilepsy, *Epilepsy Behav.*, **1**, 52 (2000).
91. J. Ma, R. Boyce, L.S. Leung, Nucleus accumbens mu opioid receptors mediate immediate postictal decrease in locomotion after an amygdaloid kindled seizure in rats, *Epilepsy Behav.*, **17**, 165 (2010).
92. L. Velisek, P. Mares, Differential effects of naloxone on postictal depression, *Epilepsy Res.*, **12**, 37 (1992).
93. B.J. Morris, H.M. Johnston, A role for hippocampal opioids in long-term functional plasticity, *Trends Neurosci.*, **18**, 350 (1995).
94. Y. Shirayama, H. Ishida, M. Iwata, G.-I. Hazama, R. Kawahara, R.S. Duman, Stress increases dynorphin immunoreactivity in limbic brain regions and dynorphin antagonism produces antidepressant-like effects, *J. Neurochem.*, **90**, 1258 (2004).
95. H. Moreno, W.E. Wu, T. Lee, A. Brickman, R. Mayeux, T.R. Brown, S.A. Small, Imaging the Abeta-related neurotoxicity of Alzheimer disease, *Arch. Neurol.*, **64**, 1467 (2007).
96. K.-S. Hui, Brain-specific aminopeptidase: From enkephalinase to protector against neurodegeneration, *Neurochem. Res.*, **32**, 2062 (2007).
97. M. Diez, J. Koistinaho, K. Kahn, D. Games, T. Hökfelt, Neuropeptides in hippocampus and cortex in transgenic mice overexpressing V717F beta-amyloid precursor protein-initial observations, *Neuroscience*, **100**, 259 (2000).
98. Z. Cai, A. Ratka, Opioid system and Alzheimer's disease, *Neuromolecular Med.*, **14**, 91 (2012).
99. M. Diez, S. Danner, P. Frey, B. Sommer, M. Staufenbiel, K.-H. Wiederhold, T. Hökfelt, Neuropeptide alterations in the hippocampal formation and cortex of transgenic mice overexpressing beta-amyloid precursor protein (APP) with the Swedish double mutation (APP23), *Neurobiol. Dis.*, **14**, 579 (2003).
100. W.J. Meilandt, G.-Q. Yu, J. Chin, E.D. Roberson, J.J. Palop, T. Wu, K. Scarce-Levie, L. Mucke, Enkephalin elevations contribute to neuronal and behavioral impairments in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease, *J. Neurosci.*, **28**, 5007 (2008).

101. K. Leung, [4-O-methyl-11C]-8-[(E)-2-(3,4-Dimethoxyphenyl)ethenyl]-1,3-diethyl-7-methylpurine-2,6-dione. Molecular imaging and contrast agent database (MICAD) - NCBI Bookshelf. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK22976/?report=reader>, accessed in October, 2014.
102. B.T. Hyman, P.J. Eslinger, A.R. Damasio, Effect of naltrexone on senile dementia of the Alzheimer type, *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*, **48**, 1169 (1985).
103. V.W. Henderson, E. Roberts, C. Wimer, E.L. Bardolph, H.C. Chui, A.R. Damasio, P.J. Eslinger, M.F. Folstein, L.S. Schneider, E.L. Teng, Multicenter trial of naloxone in Alzheimer's disease, *Ann. Neurol.*, **25**, 404 (1989).
104. R. Zhang, G. Xue, S. Wang, L. Zhang, C. Shi, X. Xie, Novel object recognition as a facile behavior test for evaluating drug effects in A β PP/PS1 Alzheimer's disease mouse model, *J. Alzheimers. Dis.*, **31**, 801 (2012).
105. M.O. Nava-Mesa, M.R. Lamprea, A. Múnera, Divergent short- and long-term effects of acute stress in object recognition memory are mediated by endogenous opioid system activation, *Neurobiol. Learn. Mem.*, **106**, 185 (2013).
106. M.O. Nava-Mesa, L. Jiménez-Díaz, J. Yajeya, J.D. Navarro-López, GABAergic neurotransmission and new strategies of neuromodulation to compensate synaptic dysfunction in early stages of Alzheimer's disease, *Front. Cell. Neurosci.*, **8**, 167 (2014).
107. M.H. Ossipov, G.O. Dussor, F. Porreca, Central modulation of pain, *J. Clin. Invest.*, **120**, 3779 (2010).
108. P. Petrovic, E. Kalso, K.M. Petersson, M. Ingvar, Placebo and opioid analgesia-imaging a shared neuronal network, *Science*, **295**, 1737 (2002).
109. J.-K. Zubieta, J.A. Bueller, L.R. Jackson, D.J. Scott, Y. Xu, R.A. Koeppe, T.E. Nichols, C.S. Stohler, Placebo effects mediated by endogenous opioid activity on mu-opioid receptors, *J. Neurosci.*, **25**, 7754 (2005).
110. Y. Hosobuchi, J.E. Adams, R. Linchitz, Pain relief by electrical stimulation of the central gray matter in humans and its reversal by naloxone, *Science*, **197**, 183 (1977).
111. B. Nicholson, Responsible prescribing of opioids for the management of chronic pain, *Drugs*, **63**, 17 (2003).

112. R.K. Fine, P. Perry, Opioid analgesia, URL: <http://www.stoppain.org/pcd/content/forpros/opioidbook.asp>, accesado en octubre, 2014.
113. F. Porreca, M.H. Ossipov, Nausea and vomiting side effects with opioid analgesics during treatment of chronic pain: Mechanisms, implications, and management options, *Pain Med.*, **10**, 654 (2009).
114. R. Benyamin, A.M. Trescot, S. Datta, R. Buenaventura, R. Adlaka, N. Sehgal, S.E. Glaser, R. Vallejo, Opioid complications and side effects, *Pain Physician*, **11**, S105 (2008).
115. A. DuPen, D. Shen, M. Ersek, Mechanisms of opioid-induced tolerance and hyperalgesia, *Pain Manag. Nurs.*, **8**, 113 (2007).
116. J.S. Goldberg, Chronic opioid therapy and opioid tolerance: A new hypothesis, *Pain Res. Treat.*, Article ID 407504 (2013).
117. M.S. Cepeda, D. Fife, Q. Ma, P.B. Ryan, Comparison of the risks of opioid abuse or dependence between tapentadol and oxycodone: Results from a cohort study, *J. Pain*, **14**, 1227 (2013).
118. G.K. Gourlay, Advances in opioid pharmacology, *Support. Care Cancer*, **13**, 153 (2005).
119. J. Jage, Opioid tolerance and dependence -Do they matter?, *Eur. J. Pain*, **9**, 157 (2005).
120. R.B. Raffa, J.V. Pergolizzi, Opioid-induced hyperalgesia: Is it clinically relevant for the treatment of pain patients, *Pain Manag. Nurs.*, **14**, e67 (2013).
121. C. Zöllner, Do opioids induce hyperalgesia?, *Anaesthetist*, **59**, 983 (2010).
122. D. Aguado, M. Abreu, J. Benito, J. García-Fernández, I.A. Gómez de Segura, Effects of naloxone on opioid-induced hyperalgesia and tolerance to remifentanyl under sevoflurane anesthesia in rats, *Anesthesiology*, **118**, 1160 (2013).
123. R.A. Cruciani, D. Lussier, D. Miller-Saultz, D.M. Arbuck, Ultra-low dose oral naltrexone decreases side effects and potentiates the effect of methadone, *J. Pain Symptom Manag.*, **25**, 491 (2003).
124. V.L. Chindalore, R.A. Craven, K.P. Yu, P.G. Butera, L.H. Burns, N. Friedmann, Adding ultralow-dose naltrexone to oxycodone enhances and prolongs analgesia: A randomized, controlled trial of Oxytrex, *J. Pain*, **6**, 392 (2005).

125. L.R. Webster, P.G. Butera, L.V. Moran, N. Wu, L. Burns, N. Friedmann, Oxytrex minimizes physical dependence while providing effective analgesia: A randomized controlled trial in low back pain, *J. Pain*, **7**, 937 (2006).
126. L.R. Webster, Oxytrex: An oxycodone and ultra-low-dose naltrexone formulation, *Expert Opin. Investig. Drugs*, **16**, 1277 (2007).
127. P. Sloan, S. Hamann, Ultra-low-dose opioid antagonists to enhance opioid analgesia, *J. Opioid Manag.*, **2**, 295 (2006).
128. R. Kariv, E. Tiomny, R. Grenshpon, R. Dekel, G. Waisman, Y. Ringel, Z. Halpern, Low-dose naltrexone for the treatment of irritable bowel syndrome: A pilot study, *Dig. Dis. Sci.*, **51**, 2128 (2006).
129. S.B. Leavitt, Opioid antagonists in pain management, practical pain management, URL: <http://www.practicalpainmanagement.com/treatments/pharmacological/opioids/opioid-antagonists-pain-management>, accesado en octubre, 2014.
130. P. Mannelli, E. Gottheil, E.J. Van Bockstaele, Antagonist treatment of opioid withdrawal translational low dose approach, *J. Addict. Dis.*, **25**, 1 (2006).
131. J. Van Bockstaele, C. Rudoy, P. Mannelli, V. Oropeza, Y. Qian, Elevated mu-opioid receptor expression in the nucleus of the solitary tract accompanies attenuated withdrawal signs after chronic low dose naltrexone in opiate-dependent rats, *J. Neurosci. Res.*, **83**, 508 (2006).
132. J. Zalewska-Kasubaska, D. Gorska, W. Dyr, E. Czarnecka, Effect of acute administration of ethanol on beta-endorphin plasma level in ethanol preferring and non-preferring rats chronically treated with naltrexone, *Pharmacol. Biochem. Behav.*, **85**, 155 (2006).
133. L. Jamot, H.W.D. Matthes, F. Simonin, B.L. Kieffer, J.C. Roder, Differential involvement of the mu and kappa opioid receptors in spatial learning, *Genes. Brain. Behav.*, **2**, 80 (2003).
134. J.L. Martínez, H. Rigter, Endorphins alter acquisition and consolidation of an inhibitory avoidance response in rats, *Neurosci. Lett.*, **19**, 197 (1980).
135. G.W. Terman, J.J. Wagner, C. Chavkin, Kappa opioids inhibit induction of long-term potentiation in the dentate gyrus of the guinea pig hippocampus, *J. Neurosci.*, **14**, 4740 (1994).

136. J.J. Wagner, L.R. Etemad, A.M. Thompson, Opioid-mediated facilitation of long-term depression in rat hippocampus, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **296**, 776 (2001).
137. J.L. McGaugh, Hormonal influences on memory, *Annu. Rev. Psychol.*, **34**, 297 (1983).
138. R.B. Messing, R.A. Jensen, J.L. Martínez, V.R. Spiehler, B.J. Vásquez, B. Soumireu-Mourat, K.C. Liang, J.L. McGaugh, Naloxone enhancement of memory, *Behav. Neural. Biol.*, **27**, 266 (1979).
139. J.L. McGaugh, I.B. Introini-Collison, A.H. Nagahara, Memory-enhancing effects of posttraining naloxone: Involvement of beta-noradrenergic influences in the amygdaloid complex, *Brain Res.*, **446**, 37 (1988).
140. B. Ferry, B. Roozendaal, J.L. McGaugh, Involvement of alpha1-adrenoceptors in the basolateral amygdala in modulation of memory storage, *Eur. J. Pharmacol.*, **372**, 9 (1999).
141. H. Zhao, H. Xu, X. Xu, Effects of naloxone on the long-term potentiation of EPSPs from the pathway of Schaffer collateral to CA1 region of hippocampus in aged rats with declined memory, *Brain Res.*, **996**, 111 (2004).
142. J. Sandin, I. Nylander, J. Georgieva, P.A. Schött, S.O. Ogren, L. Terenius, Hippocampal dynorphin B injections impair spatial learning in rats: A kappa-opioid receptor-mediated effect, *Neuroscience*, **85**, 375 (1998).
143. S. Daumas, A. Betourne, H. Halley, D.P. Wolfer, H.-P. Lipp, J.-M. Lassalle, B. Francés, Transient activation of the CA3 Kappa opioid system in the dorsal hippocampus modulates complex memory processing in mice, *Neurobiol. Learn. Mem.*, **88**, 94 (2007).
144. M. Gallagher, R.A. King, N.B. Young, Opiate antagonists improve spatial memory, *Science*, **221**, 975 (1983).
145. W.J. Meilandt, E. Barea-Rodríguez, S.A.K. Harvey, J.L. Martínez, Role of hippocampal CA3 mu-opioid receptors in spatial learning and memory, *J. Neurosci.*, **24**, 2953 (2004).
146. T.G. Aigner, M. Mishkin, Improved recognition memory in monkeys following naloxone administration, *Psychopharmacology (Berl)*, **94**, 21 (1988).

147. K.R. Katzen-Pérez, D.W. Jacobs, A. Lincoln, R.J. Ellis, Opioid blockade improves human recognition memory following physiological arousal, *Pharmacol. Biochem. Behav.*, **70**, 77 (2001).
148. J.M. Witkin, M.A. Statnick, L.M. Rorick-Kehn, J.E. Pintar, M. Ansonoff, Y. Chen, R.C. Tucker, R. Ciccocioppo, The biology of nociceptin/orphanin FQ (N/OFQ) related to obesity, stress, anxiety, mood, and drug dependence, *Pharmacol. Ther.*, **141**, 283 (2014).
149. E.M. Goldner, A. Lusted, M. Roerecke, J. Rehm, B. Fischer, Prevalence of axis-I psychiatric (with focus on depression and anxiety) disorder and symptomatology among non-medical prescription opioid users in substance use treatment: Systematic review and meta-analyses, *Addict. Behav.*, **39**, 520 (2014).
150. N.T. Bello, Z.W. Patinkin, T.H. Moran, Opioidergic consequences of dietary-induced binge eating, *Physiol. Behav.*, **104**, 98 (2011).
151. C. Giuliano, T.W. Robbins, P.J. Nathan, E.T. Bullmore, B.J. Everitt, Inhibition of opioid transmission at the μ -opioid receptor prevents both food seeking and binge-like eating, *Neuropsychopharmacology*, **37**, 2643 (2012).
152. A. Mansour, M.T. Hoversten, L.P. Taylor, S.J. Watson, H. Akil, The cloned mu, delta and kappa receptors and their endogenous ligands: Evidence for two opioid peptide recognition cores, *Brain Res.*, **700**, 89 (1995).
153. M. Fantino, J. Hosotte, M. Apfelbaum, An opioid antagonist, naltrexone, reduces preference for sucrose in humans, *Am. J. Physiol.*, **251**, R91 (1986).
154. J.M. Jonas, M.S. Gold, The use of opiate antagonists in treating bulimia: A study of low-dose versus high-dose naltrexone, *Psychiatry Res.*, **24**, 195 (1988).
155. A. Neumeister, A. Winkler, C. Wöber-Bingöl, Addition of naltrexone to fluoxetine in the treatment of binge eating disorder, *Am. J. Psychiatry*, **156**, 797 (1999).
156. T.A. Wadden, J.P. Foreyt, G.D. Foster, J.O. Hill, S. Klein, P.M. O'Neil, M.G. Perri, F.X. Pi-Sunyer, C.L. Rock, J.S. Erickson, H.N. Maier, D.D. Kim, E. Dunaevich, Weight loss with naltrexone SR/bupropion SR combination therapy as an adjunct to behavior modification: The COR-BMOD trial, *Obesity (Silver Spring)*, **19**, 110 (2011).
157. S.R. Chamberlain, K. Mogg, B.P. Bradley, A. Koch, C.M. Dodds, W.X. Tao, K. Maltby, B. Sarai, A. Napolitano, D.B. Richards, E.T. Bullmore, P.J. Nathan,

- Effects of mu opioid receptor antagonism on cognition in obese binge-eating individuals, *Psychopharmacology (Berl)*, **224**, 501 (2012).
158. S. Mohiuddin, M. Ghaziuddin, Psychopharmacology of autism spectrum disorders: A selective review, *Autism*, **17**, 645 (2013).
159. M. Leboyer, M.P. Bouvard, J.M. Launay, C. Recasens, M.H. Plumet, D. Waller-Perotte, F. Tabuteau, D. Bondoux, M. Dugas, Opiate hypothesis in infantile autism? Therapeutic trials with naltrexone, *Encephal.*, **19**, 95 (1993).
160. G.M. Elchaar, N.M. Maisch, L.M.G. Augusto, H.J. Wehring, Efficacy and safety of naltrexone use in pediatric patients with autistic disorder, *Ann. Pharmacother.*, **40**, 1086 (2006).
161. A.R. Prossin, T.M. Love, R.A. Koeppe, J.-K. Zubieta, K.R. Silk, Dysregulation of regional endogenous opioid function in borderline personality disorder, *Am. J. Psychiatry*, **167**, 925 (2010).
162. M.J. Smoski, N. Salsman, L. Wang, V. Smith, T.R. Lynch, S.R. Dager, K.S. LaBar, M.M. Linehan, Functional imaging of emotion reactivity in opiate-dependent borderline personality disorder, *Personal. Disord.*, **2**, 230 (2011).
163. T.-Y. Wang, S.-Y. Lee, S.-L. Chen, S.-Y. Huang, Y.-H. Chang, N.-S. Tzeng, C.-L. Wang, I. Hui Lee, T.L. Yeh, Y.K. Yang, R.-B. Lu, Association between DRD2, 5-HTTLPR, and ALDH2 genes and specific personality traits in alcohol- and opiate-dependent patients, *Behav. Brain Res.*, **250**, 285 (2013).
164. S.L. Tragesser, R.E. Jones, R.J. Robinson, A. Stutler, A. Stewart, Borderline personality disorder features and risk for prescription opioid use disorders, *J. Pers. Disord.*, **27**, 427 (2013).
165. Y.L. Nuller, M.G. Morozova, O.N. Kushnir, N. Hamper, Effect of naloxone therapy on depersonalization: A pilot study, *J. Psychopharmacol.*, **15**, 93 (2001).
166. D. Simeon, M. Knutelska, An open trial of naltrexone in the treatment of depersonalization disorder, *J. Clin. Psychopharmacol.*, **25**, 267 (2005).
167. A. Bystritsky, B.P. Strausser, Treatment of obsessive-compulsive cutting behavior with naltrexone, *J. Clin. Psychiatry*, **57**, 423 (1996).
168. K. Gade, C. Häussinger, B. Bandelow, Atypical anorexia in a male patient accompanied by strong obsessive-compulsive symptoms successfully treated with naltrexone, *Pharmacopsychiatry*, **42**, 164 (2009).

169. C.A. Sandman, J.L. Barron, H. Colman, An orally administered opiate blocker, naltrexone, attenuates self-injurious behavior, *Am. J. Ment. Retard.*, **95**, 93 (1990).
170. E.B. Foa, D.A. Yuskoski, C.P. McLean, M.K. Suvak, D.A. Bux, D. Oslin, C.P. O'Brien, P. Imms, D.S. Riggs, J. Volpicelli, Concurrent naltrexone and prolonged exposure therapy for patients with comorbid alcohol dependence and PTSD: A randomized clinical trial, *JAMA*, **310**, 488 (2013).
171. M.J. Niciu, A.J. Arias, Targeted opioid receptor antagonists in the treatment of alcohol use disorders, *CNS Drugs*, **27**, 777 (2013).
172. J.C. Garbutt, H.R. Kranzler, S.S. O'Malley, D.R. Gastfriend, H.M. Pettinati, B.L. Silverman, J.W. Loewy, E.W. Ehrich, Efficacy and tolerability of long-acting injectable naltrexone for alcohol dependence: A randomized controlled trial, *JAMA*, **293**, 1617 (2005).
173. K.S. Simojoki, V.A. Rosberg, M. Loyttyniemi, T. Nurminen *et al.*, Targeted nalmefene with simple medical management in the treatment of heavy drinkers: A randomized double-blind placebo-controlled multicenter study, *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, **31**, 1179 (2007).
174. Disease Management. Pharmacological options for maintenance treatment of opioid dependence include opioid agonists and antagonists, *Drugs & Therapy Perspectives*, **28**(8), 11 (2012).
175. L.R. Webster, R. Brewer, C. Wang, D. Sekora, F.K. Johnson, D. Morris, J. Stauffer, Long-term safety and efficacy of morphine sulfate and naltrexone hydrochloride extended release capsules, a novel formulation containing morphine and sequestered naltrexone, in patients with chronic, moderate to severe pain, *J. Pain Symptom. Manag.*, **40**, 734 (2010).
176. Food and Drug Administration (FDA), URL: <http://www.fda.gov/NewsEvents/Newsroom/PressAnnouncements/ucm406407.htm>, accessed en octubre, 2015.
177. J.P. Smith, S.I. Bingaman, F. Ruggiero, D.T. Mauger, A. Mukherjee, C.O. McGovern, I.S. Zagon, Therapy with the opioid antagonist naltrexone promotes mucosal healing in active Crohn's disease: A randomized placebo-controlled trial, *Dig. Dis. Sci.*, **56**, 2088 (2010).
178. K. Papay, S.X. Xie, M. Stern, H. Hurtig, A. Siderowf, J.E. Duda, J. Minger, D. Weintraub, Naltrexone for impulse control disorders in Parkinson disease: A placebo-controlled study, *Neurology*, **83**, 826 (2014).

Novel gel-like microemulsion for topical delivery of Amphotericin B

Claudia Salerno¹, Susana Gorzalczy², Alicia Arechavala³, Silvia L. Scioscia¹, Adriana M. Carlucci¹, Carlos Bregni^{1*}

¹ Department of Pharmaceutical Technology, Faculty of Pharmacy and Biochemistry, University of Buenos Aires, Buenos Aires, Junin 956. 6th floor - (1113), Argentina.

*E-mail: cbregni@gmail.com; cbregni@gmail.com.

² Department of Pharmacology, Faculty of Pharmacy and Biochemistry, University of Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina.

³ Mycology Unit. Hospital de Infecciosas F. J. Muñiz, CABA, Argentina.

Recibido para evaluación: 27 de abril de 2015.

Aceptado para publicación: 15 de noviembre de 2015.

SUMMARY

The aim of the present work was to develop a ME for topical delivery of Amphotericin B (AmB). Microemulsions (MEs) are versatile systems to solubilize drugs due to the presence of both a hydrophobic and a hydrophilic region, as well as a distinctive interface composed of surfactant and cosurfactant. MEs have been reported for many advantages for topical application of drugs. Considering that AmB has very low water solubility a screening of surfactants and oils was performed. A gel-like ME system, that can be applied topically without the need for thickeners agents, was selected. AmB was incorporated up to 1 mg/g and remained stable for at least 90 days both at 4 °C and room temperature, so this formulation would be appropriate as a compounding medication. An *in vitro* skin penetration test was performed, the applied dose penetrated ($10.16 \pm 0.01 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$ as estimated flux) and remained completely within the skin during the assay; AmB was not detected in the receptor compartment. *In vitro* antifungal and antileishmanial activity was tested and drug showed proper activity. AmB is a second line drug for the treatment of cutaneous leishmaniasis, but topical dosage forms are still lacking. This system is potentially useful for the treatment of skin infections avoiding drug toxic systemic effects.

Key words: Gel-like microemulsion, amphotericin B, topical delivery, cutaneous leishmaniasis.

RESUMEN

Una nueva microemulsión tipo gel para la aplicación tópica de anfotericina B

Se desarrolló una microemulsión (ME) para la aplicación tópica de anfotericina B (AmB). Las ME son sistemas versátiles que facilitan la solubilización de principios activos y, además, presentan muchas ventajas para aplicar fármacos en forma tópica. La AmB posee muy baja solubilidad en agua, por lo cual se realizó una evaluación de su solubilidad en distintos aceites y surfactantes. Se confeccionaron diagramas ternarios de fase y se seleccionó una ME-gel que puede ser aplicada tópicamente sin el agregado de agentes espesantes. Se solubilizó hasta 1 mg/g de AmB y el fármaco permaneció estable durante al menos 90 días a 4 °C y a temperatura ambiente, por lo cual esta formulación sería apropiada como un medicamento magistral. El estudio *in vitro* de permeación en piel mostró que la dosis aplicada penetró completamente (flujo estimado de difusión $10,16 \pm 0,01 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$) y permaneció retenida en la misma durante el tiempo de estudio sin detectarse AmB en el compartimento receptor. La actividad antifúngica y antileishmania *in vitro* fue adecuada. La AmB es una droga de segunda línea en el tratamiento de la leishmaniasis cutánea; sin embargo, no se dispone de preparados para uso tópico. Esta formulación sería útil para el tratamiento local de las infecciones de piel, evitando efectos adversos sistémicos.

Palabras clave: microemulsión tipo gel, anfotericina B, aplicación tópica, leishmaniasis cutánea.

INTRODUCTION

Microemulsions (MEs) are defined as translucent isotropic thermodynamically stable systems composed of an oil phase, an aqueous phase, and a mixture of a main surfactant and a co-surfactant. MEs can be prepared from a wide variety of oils and surfactants. For some time now, MEs have been extensively studied because of their advantages such as increased solubility of drugs, stability and easy preparation. On account of their versatility and biocompatibility MEs have been investigated for parenteral, oral and topical administration. Several authors have studied MEs potential to improve topical and transdermal administration of drugs in comparison with other conventional vehicles. The increased efficiency of penetration-permeation of the drugs carried into MEs can be attributed to the combined action of composition and structural factors. Due to the presence of hydrophilic and lipophilic domains, it is postulated that

MEs can interact with both lipids and proteins of SC; several mechanisms have been proposed to explain the role of MEs for the skin penetration and transdermal passage of drugs. Many hydrophilic and hydrophobic drugs have been incorporated in MEs to increase penetration and skin permeation [1-10].

Although MEs are homogeneous systems in sight, microscopically they are dynamic heterogeneous systems in which the interface spontaneously fluctuates. A surfactant dispersed in an aqueous media would associate in different equilibrium phases, depending on van der Waals forces and the system entropy. During ME formation the increase in interfacial area is very important (in the order of $10^4 - 10^5$) due to the great number of new droplet. Surfactants generally orientate in order to optimize solvation and reduce free energy, so surfactant-cosurfactant mixture is located at the interface. Three main types of MEs can be formed: o/w or w/o depending whether the internal phase is oil or water, and bicontinuous ME when surfactants form a continuous domain along the oil-water interface with a zero net curvature [10-12].

According to some researchers a gel-like ME is an o/w system where there is a strong hydration of the surfactant hydrophilic chains, which connect themselves through hydrogen bonds resulting in a strong interaction among droplets that modifies ME viscosity [4, 13]. It has also been described that less ordered MEs are more fluid, while those more ordered (cubic and hexagonal phases) show the elastic properties of solids [14, 15]. Another case is that of lecithin, which forms cylindrical or worm-like micelles in MEs with low water content, whose interactions tend to produce a large increase in the viscosity of the system [16, 17]. Gel-like ME systems are useful for topical application without the need of an additional viscosity modifier, also they may enhance drug residence time and regulate drug release in some cases [18].

The polyene macrolid antifungal Amphotericin B (AmB) has a very low solubility in water (1 $\mu\text{g/ml}$) at physiological pH and is unstable in solution, also AmB causes many adverse effects when administered by parenteral route. Many strategies have been attempted to get over these problems; although some of them have improved AmB therapeutic index and reduced adverse effects, they resulted in expensive medications or higher required doses. AmB is used for invasive infections caused by *Candida spp.* and *Aspergillus spp.*, and is a second line drug for *Leishmania spp.* parasites [19, 20].

Cutaneous leishmaniasis (CL) is the most prevalent clinical form of the disease caused by *Leishmania spp.* CL has been treated so far with sodium stibogluconate and meglumine antimoniate as first line treatment but there is concern about adverse effects such as cardiotoxicity, liver and kidney failure, and the emerging resistance favored by low patient compliance to long parenteral treatments; there is a need for new drugs or more

cost-effective therapies with improved formulas. Although CL is usually self-limiting, the goal of the treatment is to prevent disfiguring lesions and the development of more serious forms of disease [21-24]. In some cases of CL drugs were administered locally intralesion; AmB in lipidic formulations with the addition of ethanol was shown to be effective for the local treatment of CL and it was reported the case of a pediatric patient with persistent CL whose lesions healed after a 3-week topical treatment with AmB cholesteryl sulfate with the addition of ethanol 5% [25-27]. Although progress was made in the knowledge of the pathology, we are still in need of greater commitment for the prevention and control of this neglected disease that mainly affects the poorest regions of the world. In early stages of the disease or cases with no risk of systemic complication topical treatment would offer lower toxicity, ease of administration, better patient compliance and lower costs. The aim of the present work was to develop a topical ME to deliver AmB, evaluate stability, *in vitro* activity and skin penetration.

MATERIALS AND METHODS

Materials

Amphotericin B (AmB) Alpharma, was kindly supplied by Unifarma SA, Argentina; Polyoxyethylene (10) oleyl ether (Brij[®] 97) and Polyoxyethylene (4) lauryl ether (Brij[®] 30) were kindly provided by Croda LA; lauryl alcohol 2 OE (Dehydol[®] LS 2 HN), and oleyl-5 (Emulgin[®] O5) were supplied by Cognis Argentina. Sorbitan monooleate (Span[®] 80) was purchased from Droguería Saporiti, Argentina; castor oil and *Carboxymethyl cellulose sodium* (CMC) were purchased Fabriquímica S.R.L., Argentina. Mygliol[®] 812 (capric-caprylic triglycerides) was provided by Phoenix Laboratory, Argentina. Amphotericin B Deoxycholate Northia[®] (L: 695), Argentina. Isopropyl myristate (IPM), sweet almond oil, jojoba oil, soya oil, Tween[®] 80 and all other reagents were of pharmaceutical or analytical grade. Full-thickness skin for percutaneous absorption test was excised from 4-month-old domestic pig ears from a local commercial supplier (Nueva Granja Burzaco; Rauch, Buenos Aires Argentina). Other materials including *Candida* species and *L. brasiliensis* can be found in the corresponding method sections.

Determination of AmB solubility in surfactants and oil phases

AmB solubility was determined by adding an excess of drug (20 mg) to 10 g of selected oils or surfactants into a glass vial ($n = 3$). Vials were protected from light and kept under magnetic stirring at room temperature for 96 h. Then, the equilibrated mixtures were centrifuged at 2500 rpm for 15 min and the supernatant was taken and filtered through a 0.45 μm PTFE (Millipore) filter. A 200 μl aliquot was transferred into a

10 ml volumetric flask and volume was adjusted with either a mixture of methanol: chloroform (50:50) or pure methanol according to excipient miscibility or solubility. AmB concentration was determined by UV spectrophotometry (UV-VIS Spectrophotometer Shimadzu UV-260) at 406 nm, calibration curve of AmB in methanol (range 0.5-10 $\mu\text{g/ml}$; $r^2 = 0.9995$ -1.000) and methanol: chloroform (range 1.0-20 $\mu\text{g/ml}$; $r^2 = 0.9910$). Blanks were prepared for the same dilutions of each oil or surfactant in methanol or solvents mixture, as appropriate.

Pseudoternary phase diagrams

Pseudoternary phase diagrams were constructed to determine ME areas for the following surfactant: cosurfactant (S+CoS) ratios (w/w) 1:1; 1:2; 1:3; 2:1 and 3:1. The surfactant was selected on results of the solubility study and ethanol was included as cosurfactant. Mixtures were added to IPM as oily phase for the ratios: (S+CoS:IPM): 9:1; 8:2; 7:3; 6:4; 5:5; 4:6; 3:7; 2:8; 1:9. Samples were prepared at room temperature. The appropriate amount of reagents was weighed and mixed gently. Then, distilled water was added dropwise, with mild magnetic stirring until visual change of an isotropic transparent to opalescent – turbidity transition. Visual observation was made and recorded as transparent isotropic fluid o/w ME, transparent isotropic o/w gel (gel-like ME) or milky emulsion. We searched for o/w ME areas (isotropic and fluid) and o/w gel-like ME (isotropic gel). Limits for each phase were established by visual observation of transition transparency-turbidity; there was no intention to identify other phases.

Preparation of AmB loaded gel-like ME

Gel-like ME was prepared by first mixing surfactant with cosurfactant and then this mixture was added to IPM in a water bath at 40 °C, with mild stirring. Distilled water was slowly added dropwise with continuous mixing. Then sample was removed from the water bath and subsequently AmB was added. The preparation was kept protected from light under mild magnetic stirring until total dissolution of AmB.

Amphotericin B concentration and stability

AmB-loaded gel-like ME was centrifuged 30 min at 2500 rpm to evaluate signs of separation or drug precipitation. Drug concentration in the selected gel-like ME system was determined at the time of preparation; about 100 mg of the gel-like ME was exactly weight and diluted to 10.0 ml with methanol. The sample was stirred until complete dissolution of gel-like ME. AmB concentration was determined by UV spectroscopy (see above).

For stability study samples were stored at room temperature, at 4 °C and 40 °C. At fixed intervals samples were observed for signs of separation or drug precipitation and an aliquot of about 100 mg was exactly weight and put into a glass vial with 10.0 ml of methanol. Sample was left under magnetic stirring for complete dissolution and AmB was determined by HPLC (Shimadzu SPD-10 A vp Uv/Vis Detector). A Microbore C18 (150 × 2.0 mm, 3 μm) Waters Spherisorb® S3 ODS2 column was used with an isocratic mobile phase composed of acetonitrile: disodium edetate 2.5 mM (45:55) [28]. The injection volume was 20 μl and the flow rate was 0.4 ml/min. UV detection was set at 382 nm and retention time was 4.0 ± 0.1 . Linearity curve was determined for the range 0.06-1.60 μg/ml ($r^2 = 0.9989$). External standard was also used during the measurements.

Gel-like ME characterization

Phase-contrast and polarized light microscopy

Phase-contrast and polarized light microscopy was used to microscopic observation of the gel-like ME. Observations were made at 200X magnification using an Axioskop 2 Plus, Zeiss, Germany, equipped with a Sony Exwave HAD video camera to collect digital images (768 × 494 pixels). A small quantity of sample was placed on the on the glass-slide and covered with a cover slip without any additional treatment. The glass-slides were previously cleaned with ethanol and acetone.

Refractive index

Refractive index was measured with an Officine Galileo Refractometer ($E_0 = -0.0002$) at room temperature without any treatment of samples. Determinations were made at initial time (48 h after preparation), 1 and 3 months for samples stored at room temperature and at 4 °C. Refractive indexes of distilled water and glycerin were also determined at each control time as references. Results are given as mean $\pm$ SD ($n = 3$).

Conductivity

Conductivity was determined for the blank and AmB-loaded gel-like ME with no additional treatment at initial time (48 h after preparation), 1 and 3 months using a thermo-conductimeter Antares IV; Parsec SA, Argentina. Results are given as mean $\pm$ SD ($n = 3$).

pH determination

Sample pH was determined at 25 °C with a pH-meter TPA III Altronix. Before measurement samples were diluted 1/10 with distilled water adjusted to neutral pH 7.10 ± 0.02 . Results are given as mean $\pm$ SD ($n = 3$).

Viscosity and Rheology

Rheological behavior of Amb-loaded gel-like ME was evaluated. Samples stored at room temperature and 4 °C were assayed after a week of preparation in order to evaluate if storage conditions affects the gel-like structure and viscosity, and also because it is recommended to store AmB preparations in the refrigerator. A rotational viscometer was employed (Brookfield PVT synchro-Lectric viscometer). Viscosity was measured through the rotation speed of the spindle number 6 immersed in the sample. The test was carried out at 25 ± 1 °C and the spindle was rotated at 0.5 rpm. The readings were made after ten minutes. The rheological behavior was evaluated by increasing velocity (0.5- 1-2.5-10 and 20 rpm), readings were made after 5 min at each frequency.

In vitro skin penetration-permeation study

In vitro skin penetration-permeation experiments were performed on Franz diffusion cells using pig ear skin. Pig ears were obtained from a local pork slaughterhouse for human feeding. However, approval has been obtained from the Ethical Committee for the Care and Use of Laboratory Animals of the Faculty of Pharmacy and Biochemistry, University of Buenos Aires (N° 170511-2). Skin was excised from 4-month-old domestic pig ears, obtained from a local commercial supplier. The pig ears were cleaned under running water immediately after excision. The hair from the outer region of the ears was removed and then the skin was carefully separated from cartilage using a scalpel. Subsequently, adipose subcutaneous tissue was removed; full-thickness skin was used with a surface area of 3.14 cm², thickness of 1 mm for all the samples was controlled with a vernier. After being dried with a tissue, the skin was immediately mounted on the diffusion cells or frozen at -20 °C for a maximum period of 4 weeks [29, 30].

The skin was placed horizontally on Franz diffusion cells, between the donor and receptor compartments. Sink conditions were obtained in the receptor compartment by phosphate-buffered saline (PBS; pH 7.4) with 1% sodium lauryl sulfate (PBS-LSNa); solubility in receptor media was previously determined. The volume of receptor fluid was 15 ml. The receptor compartment was continuously homogenized using a stirring magnetic bar and the temperature was kept at 32 °C using a water circulation system. The skin mounted in the cell was allowed to rest for an hour in contact with receptor media before the application of the samples. Gel-like ME loaded with AmB 1 mg/g and AmB Deoxycholate hydrogel were assayed simultaneously. For the hydrogel preparation AmB Deoxycholate marketed formulation was reconstituted with distilled water, according to instructions, and thickened with CMC 2%. Experiments were performed applying 200 µg of AmB as dose for both formulations.

Serial sampling (6 ml) was performed after 0.5, 1, 2, 4 and 6 h, and fresh receptor liquid was added to receptor compartment in order to replace the buffer. Aliquots were filtered by 0.45 μm nylon filter (CAMEO) and analyzed by HPLC as described above; retention time for samples in PBS-LSNa was 3.4 ± 0.0 min.

After the experiment, the remnant of the dosage form on the skin was put in a glass vial, skin was washed twice with methanol to recover any rest of the applied dose and the used spatula was also washed so as to collect the dosage form completely. The final volume was adjusted with methanol and the mixture was stirred at 2,500 rpm for 1 h. The solution was filtered and AmB was quantified by HPLC (method was previously assayed for drug recovery). Skin drug penetration, considered as the amount retained within the skin, was calculated by difference between the total dose applied and the sum of the amount that permeated plus the amount present in the remnant sample over the skin. After cleaning the skin as mentioned above stratum corneum (SC) was separated by stripping method [31].

Adhesive tape 3 M Scotch was used to remove SC layers, consecutive adhesive tape strips 1-7 and 8-12 were put in separate vials containing 10.0 ml of methanol and were left under magnetic agitation at room temperature for 24 h and then vortexed for 1 min; after that an aliquot was taken and filtered by 0.45 μm before analyzing. The remaining stripped skin (viable epidermis and dermis; VED) was minced and placed into a vial containing 10.0 ml methanol and treated with an Ultraturrax® T25 Basic (IKA Labortechnik, Germany) with an ice bath, 2 min at 19000. Samples were then left in a shaker at room temperature overnight to ensure adequate extraction of the drug from the skin; after that time samples were centrifugated at 2,500 rpm and supernatants were filtered by 0.45 μm nylon filter and presence of AmB was determined by HPLC.

***In vitro* antifungal activity**

The minimal inhibitory concentration (MIC) of AmB-loaded gel-like ME was determined according to M27-A3 CLSI method for several strains of *Candida* and different patient isolates [32]. A suspension of *Candida* (1×10^6 UFC/ml) was incubated with 100 ml of solutions with different concentrations of the antifungal in DMSO ([32] 0.06 mg/ml) or the corresponding dilutions of gel-like ME in a 96-well plate at 35 °C for 48 h. Visual readings were performed after 24 and 48 h. AmB deoxycholate from market (Anfotericina B Northia®, Argentina), AmB standard used as reference in the microbiological lab and AmB raw material used for the preparation of gel-like ME were tested as controls. The MIC was defined as the lowest drug concentration inhibiting clearly visible growth of the fungi. 100 ml of RPMI-solvent without AmB and 200 ml of RPMI-solvent were placed in wells for growth control and for sterility control, respectively. Blank gel-like ME was tested as negative control.

***In vitro* antileishmania activity**

(^3H) thymidine incorporation assay was performed on *L. brasiliensis* promastigotes (M2903 strain). Exponentially growing parasites were centrifuged at 1200 g for 15 min, adjusted to a cell density of 10^3 - 10^7 parasites/ml in fresh LIT medium supplemented with 10% de complemented fetal bovine serum (Gibco), 100 U/ml penicillin and 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ streptomycin. Parasites were seeded in a 96-well microplate (150 μl per well) in presence of 1 μCi (^3H) thymidine (^3H -T; Perkin Elmer) and allowed to grow incorporating ^3H -T during 16 h. Counts per min (cpm) of triplicate cultures were measured by an automated liquid scintillation counter (Packard, Downers Grove, IL). Parasites drug susceptibility was assayed for dilutions (ethanol: water) of AmB loaded gel-like ME and AmB Deoxycholate as reference during 72 h. For the last 16 h of culture, cells were pulsed with 1 μCi per well ^3H -T. Medium and ethanol:water were assayed as control of 0% of parasites inhibition [33].

Skin irritation test

Albino male rabbits weighing 1.8-2 kg were used. The experiments were carried out taking into account international guiding principles and local regulations concerning to the care and use of laboratory animals for biomedical research. The experiments were approved by the local Ethics Committee (Exp-FyB: 00747495/2012). The animals had free access to a standard commercial diet and water ad libitum and were kept in room maintained at 22 ± 1 °C with a 12-h light/dark cycle.

The irritancy of formulation was determined based on the method described by Draize *et al.* The backs of six animals were clipped free of hair 24 h before the beginning of the assay. Gel-like ME loaded with AmB 1 mg/g was tested on two one inch square sites on the same animal; one site was intact and one was abraded in such a way that the stratum corneum was opened but without bleeding. Formulations were tested undiluted (0.5 g). Each test site was covered with two layers of one inch square surgical gauze secured in place with tape. The entire trunk of the animal was then wrapped with rubberized cloth in order to retard evaporation and hold the patches in one position. 24 h after application, the wrappings were removed and the test sites evaluated for erythema and edema. Evaluations of abraded and intact sites were separately recorded. Test sites were evaluated again 48 and 72 h after application by the same procedure. Maximal score was set in 8. The criterion for skin irritation intensity was assumed as follows: < 0.5 no irritation, 0.5-3 slight irritation and > 6 severe irritation [34, 35].

Statistical Analysis

Data were analyzed using software MS Excel 2007 Data Analysis Add-In programme. T-Student test was performed to see any significant difference ($p < 0.05$).

RESULTS AND DISCUSSION

AmB solubility in surfactants and oil phases

MEs are an interesting system to solubilize poor water soluble drugs so AmB solubility was assayed in several surfactants and oils. Table 1 shows AmB solubility in oil phases and surfactants. AmB proved to be poor soluble in the assayed oils. Among surfactants Emulgin® O5, a polyoxyethyleneoleyleter, turned out to have the best solubilizing capacity.

Table 1. Amphotericin B solubility in different oils and surfactants.

Excipient (oily phase)	Solubility ($\mu\text{g/ml}$)	Excipient (surfactant)	HLB	Solubility ($\mu\text{g/ml}$)
Castor oil	< 1.0	Tween® 80	15.0 ^a	< 0.5
Sweet almond oil	< 1.0	Brij® 97	12.4 ^a	8.02 $\pm$ 0.51
Jobba oil	< 1.0	Brij® 30 (laureth-4)	9.7 ^a	< 0.5
Soya oil	< 1.0	Emulgin® O5	9.0 ^b	51.13 $\pm$ 2.3
Mygliol® 812	< 1.0	Dehydol® LS 2 HN	6.4 ^b	< 0.5
Isopropyl Miristate	< 1.0	Span® 80	4.3 ^a	6.01 $\pm$ 0.49

^a Handbook of Pharmaceutical Excipients. 6th Ed. (2009) Rowe RC, Sheskey PJ y Quinn ME. APHA- Pharmaceutical Press (UK-USA); ^b Calculated according to Pasquali *et al.* Int. J. Pharm. 356 (1-2): 44-51 (2008).

Phase diagrams and gel-like ME selection

In the search for an extemporaneous formulation with better drug stability we made the attempt to solubilize AmB in ternary mixtures of oils and surfactants studied as potential SMEDDS (self micro-emulsifying drug delivery system) to form ME by water addition. However, the assayed mixtures were not able to significantly enhance drug solubilization. Therefore we searched for ME containing Emulgin® O5, the surfactant in which AmB showed greatest solubility. Ethanol was selected as cosurfactant because as previously mentioned some studies reported that AmB formulations mixed with ethanol were effective for the local treatment of CL. Phase diagrams were constructed with Emulgin® O5, ethanol and IPM was selected as oil phase. Figure 1 shows ME and gel-like ME areas for different ratios S-CoS.

Soy oil was also tested as oily phase but MEs containing this oil were not able to significantly enhance AmB solubility and they had low stability; glyceryn, propylene glycol and diethyleneglycol monoethyl eter (Transcutol® P) were also assayed as cosurfactant but they did not form stable MEs with acceptable surfactant concentration (data not shown).

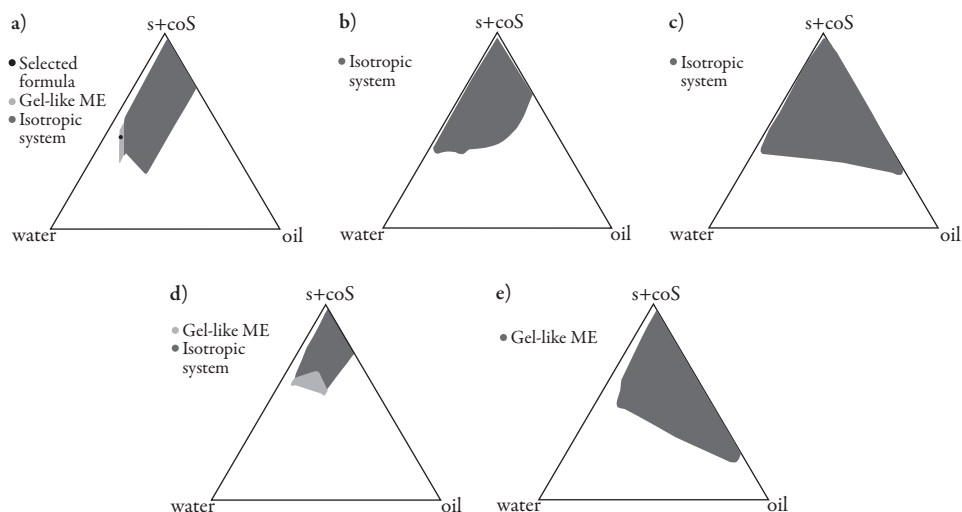


Figure 1. ME and gel-like ME areas for different ratios surfactant-cosurfactant (S-CoS). a: 1:1; b: 1:2; c: 1:3; d: 2:1; e: 3:1.

A gel-like ME system (so called *like-gel* ME) was selected because of its suitability to be applied on the skin without the need of additional viscosity modifiers. The ratio surfactant: cosurfactant was set 1:1 in order to use the formulation with less surfactant content for low skin irritancy. Among ME areas found, w/o ME were not selected because of the low oil solubility of AmB and because they are also less comfortable for topical application than o/w ME. An o/w gel-like ME (IPM 5%, Emulgin® O5 20%, Ethanol 20% and distilled water qs 100%; Figure 1a) was selected as optimum candidate for further study as it was the one that remained more stable during macroscopic observation and the one that allowed greater drug loading during preliminary evaluation of possible compositions. When preparing MEs temperature and mixing speed can affect the formation of an isotropic phase. For the gel-like ME is very important to keep mild stirring while adding slowly the aqueous phase, otherwise high stirring velocity would lead to hazy system because of the entrapment of air, and the translucent system is reached after leaving the system to equilibrate.

Ternary mixtures were not able to enhance AmB solubilization; therefore, AmB was incorporated to the whole prepared gel-like ME. It is to remark that a greater quantity of AmB solubilized in the complete ME than in the surfactants mixture, this fact may be explained by the amphiphilic and amphoteric nature of the drug (pK_a –COOH 5.7 y pK_a –NH₂ 10.0), so drug would locate in the interface with the surfactant monomers, thus leading to a greater solubility in the complete ME containing the aqueous phase.

Similar results were reported for lecithin based formulations and other amphiphilic association systems for AmB [36-38].

Amphotericin B concentration and stability

Blank gel-like ME and AmB loaded samples showed neither changes nor precipitated drug after centrifugation test. The selected formula solubilized up to 1 mg/g of AmB (1.00 ± 0.06 mg/g) at time 0. Samples stored at 4 °C were stable for at least 3 months, AmB concentration > 90% ($97.96 \pm 5.99\%$) and no macroscopic change was observed, whereas the drug content for samples at room temperature was $94.97 \pm 7.12\%$ after that period of time and the gel structure became more fluid. On the contrary AmB concentration in samples stored at 40 °C was $88.69 \pm 4.08\%$ after one month of storage and also drug precipitated was observed at the bottom of vials.

Since AmB desoxycholate forms weak micelles with poor stability after reconstitution, reconstituted preparation has to be used within a week therefore the use of AmB desoxycholate marketed formulations for topical application as was reported elsewhere would be less convenient; the type of ME presented here may offer an alternative for topical treatment and according to stability AmB loaded gel-like ME could be prepared as a compounding formulation.

Gel-like ME characterization

Macroscopic aspect of gel-like ME is shown in Figure 2. Figure 3 shows microscopy images of loaded gel-like ME, blank samples showed no difference. Even though the system is macroscopically isotropic, round structures could be observed due to birefringence when visualized by phase-contrast and polarized light microscopy.

The structural characteristics and mechanical behavior depend on the composition of the system. It is known that less ordered ME usually have low viscosity, whereas the more ordered hexagonal or cubic phases show viscoelastic properties of a jelly-like phase [15, 36]. According to some authors, ME viscosity may be due to the oily phase properties and the diameter of internal phase droplets; in diluted ME the small number of droplets had no important effect on viscosity, however when the number of droplets raise, droplet-droplet interactions become prevalent and the friction can lead to a raise in viscosity [14]. Another assumption is that in o/w systems with more than 50% of water, hydrophilic groups of surfactant are highly hydrated and interconnected by hydrogen bond, which lead to a gel structure [13]. The behavior seen in the ME presented herein, is possibly in accordance to a ME with sodium dodecyl sulfate and ethanol for which a viscous region was described, called region S, as a stable viscous region where phases L4 and L α (vesicular and lamellar phase) coexist. That region S viewed by polarized microscopy showed large spherules dispersed in a continuous isotropic



Figure 2. Macroscopic aspect of gel-like ME blank and loaded with Amphotericin B 0.5 and 1 mg/g.

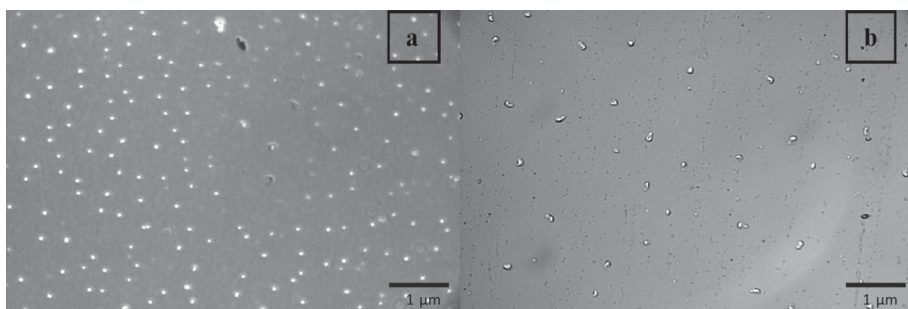


Figure 3. Microscopic images of AmB-loaded gel-like ME. a: phase contrast microscopy; b: polarized light microscopy (200X).

medium, being the weak birefringence due to the presence of such spherules. ME with low ethanol content are turbid and they get clear as ethanol content or temperature raise and the viscosity of the ME in this region is considerably affected by the preparation method [39]. In our study, images seen by phase contrast and polarized light microscopy would be consistent with this type of system. It is also important to con-

sider that drug itself may alter phase behavior when it has surfactant property; however in this case AmB did not alter the gel-like ME despite of being amphiphilic.

Physicochemical parameters are shown in Table 2. RI (refractive index) was no modified by the incorporation of AmB. Readings remained water < gel-like ME < glycerin during the period assayed. pH of blank sample was lower than the one loaded with AmB. The selected gel-like ME showed electroconductivity according to o/w ME, despite the non-ionic nature of main surfactant (parameter was assessed without the addition of electrolytes) and the viscosity of the sample. Conductivity was similar for the blank formulation than the loaded one (no significantly difference, $p > 0.05$), so we conclude the drug did not affect the external phase of the ME.

Table 2. Gel-like ME physicochemical characterization.

	Blank gel-like ME				
	Storage condition	4 °C		25 °C	
Time (m) Parameter	0	1	3	1	3
pH	6.29 ± 0.09	---	6.15 ± 0.10	---	5.76 ± 0.07
RI	1.3767 ± 0.0007	1.3767 ± 0.0004	1.3766 ± 0.0004	1.3779 ± 0.0003	1.3783 ± 0.0023
Conductivity (μS.cm ⁻¹)	69.50 ± 6.27	---	51.90 ± 0.10	---	50.96 ± 0.10
	AmB-loaded gel-like ME				
	Storage condition	4 °C		25 °C	
pH	7.33 ± 0.18	---	7.34 ± 0.06	---	6.18 ± 0.01
RI	1.3769 ± 0.0005	1.3776 ± 0.0004	1.3774 ± 0.0001	1.3769 ± 0.0004	1.3786 ± 0.0019
Conductivity	55.17 ± 5.95	---	49.05 ± 0.45	---	48.95 ± 0.55

RI: refractive index; water RI = 1.3332 ± 0.0003; glycerin RI = 1.4718 ± 0.0001.

At the time of preparation the gel-like ME appears as a soft gel, both blank and the loaded one, that can be rotated in the beaker but samples showed a more rigid appearance after storage at 4 °C. AmB-loaded gel-like ME showed a pseudoplastic behavior without thixotropy (Figure 4). Samples stored at room temperature were visibly less viscous after three months and the system could easily flow through the vial wall. On basis of stability of AmB and gel structure, this formulation should be store at 4 °C.

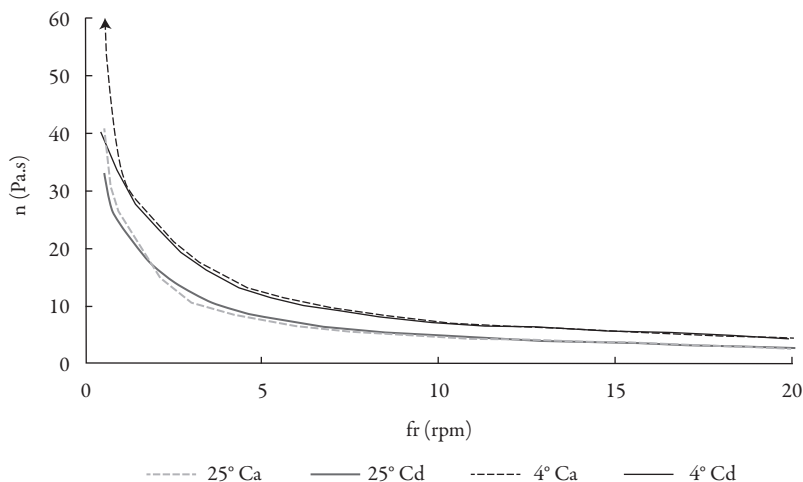


Figure 4. Rheological behaviour of AmB gel-like ME, a: ascending rotational speed; d: descending rotational speed.

In vitro AmB penetration-permeation

Study showed that AmB penetrated almost completely within the skin ($99.23 \pm 0.06\%$) without permeation to receptor fluid during the time of assay after application of AmB-loaded gel-like ME; the estimated rate of penetration into the skin was $10.16 \pm 0.01 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$. On the case of AmB deoxycholate hydrogel the drug penetrated the skin at the same extent ($99.65 \pm 0.04\%$; penetration rate $9.56 \pm 0.05 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$), however drug was detected in receptor media after 1 h of application (Table 3). Permeation was statistically different for the two formulations ($p < 0.05$). At the end of assay drug was only detected in stratum corneum (SC) for the AmB-loaded gel-like ME, whereas for the AmB deoxycholate hydrogel drug was found in SC, viable epidermis and dermis (data not shown) according to permeation behavior. AmB diffused completely into skin, however in the case of the AmB-loaded gel-like ME drug was retained within the skin during the assay, this longer residence time within the skin would help local effect and could prevent from systemic adverse effects.

As it was mentioned, ME have many advantages for topical administration of drugs, moreover o/w ME can behave as reservoir increasing local effect of drugs. In our study AmB diffusion within the skin was slower for the gel-like ME than the AmB deoxycholate hydrogel and the estimated penetration ratio into the skin was much higher than penetration results showed by other researchers when AmB was vehiculized in liposomes [28]. ME good skin penetration has already been study, nonetheless in this case the composition of the system could have helped even more. It was reported that

some polyethylene ethers are effective skin penetration enhancers, because of their hydrophilic and lipophilic molecule portions they cause disruption of lipids in the SC and increase water content of the protein domain [8, 40].

Table 3. *In vitro* AmB penetration-permeation into pig ear skin.

Sample	Initial quantity (µg)	Remnant after 6h (µg)	Released quantity (µg)	Drug in Receptor media (µg)	Drug within the skin (µg)
Gel-like ME	192.80 ± 0.01	1.44 ± 0.12	191.35 ± 0.12	Non detected	191.35 ± 0.12
AmB Deoxycholate hydrogel	180.07 ± 2.34	0.63 ± 0.07	179.44 ± 2.41	1.44 ± 0.15	180.41 ± 1.3

***In vitro* antifungal activity**

In order to assess *in vitro* antifungal activity of AmB-loaded gel-like ME, MIC was determined for several strains of *Candida* and different patient isolates. Results are shown in Table 4. The MIC for AmB-loaded gel-like ME for *Candida spp.* was greater than MIC for AmB deoxycholate possibly due to viscosity of the formulation affecting drug diffusion in the culture media, since AmB deoxycholate was tested as solution. Nonetheless it has to be considered that our controls (AmB standard and AmB raw

Table 4. AmB Minimal inhibitory concentration (MIC) against different cultures.

Specie	Origin	MIC (µg/ml)			
		AnfotericinaB Northia [*]	AMB ME-gel	AMB st	AmB rm
<i>C albicans</i>	40139	0.030	0.250	0.125	0.125
<i>C albicans</i>	64548	0.030	0.250	0.250	0.060
<i>C albicans</i>	129	0.030	0.250	0.125	0.060
<i>C albicans</i>	549	0.030	0.250	0.125	0.060
<i>C albicans</i>	Oral Mucosa	0.030	0.250	0.250	0.125
<i>C albicans</i>	Sputum	0.030	0.250	0.125	0.060
<i>C albicans</i>	Hemoculture	0.030	0.250	0.125	0.060

st: standard; rm: raw material.

material) also had MIC values were greater than the reference for some samples, which could also explain the greater MIC results for the formulation assayed. Nevertheless we can conclude that AmB antifungal activity is appropriate for this novel formulation since susceptible species of fungi are inhibited by concentration of AmB ranging from 0.03 to 1.00 $\mu\text{g/ml}$ but *in vivo* studies are necessary to assess clinical effectiveness [41].

In vitro antileishmania activity

In vitro inhibitory activity of *L. braziliensis* promastigotes growth is shown in Figure 5. AmB loaded gel-like ME has the same activity as the reference AmB deoxycholate, for 100 $\mu\text{g/ml}$ and 1 $\mu\text{g/ml}$ concentration there was no significant difference ($p > 0.05$). However, blank formulation had inhibitory activity of parasite growth, $75.04 \pm 11.20\%$ with no difference respect to AmB-loaded gel-like ME ($p > 0.05$); this fact was also reported for AmB solubilized with poloxamer 188 in a micellar formulation [42]. Furthermore, surfactants had strong lytic effect against *Trypanosoma cruzi*, a parasite of the same family as *Leishmania*, as was the case of Tween 20 and polyethylcyanoacrylate nanoparticles which had activity against parasite cells and enhanced activity of nifurtimox [43-45]. Surfactants modify parasite membrane, producing change in fluidity and leakage of vital substances, although in our study there was not synergism [46].

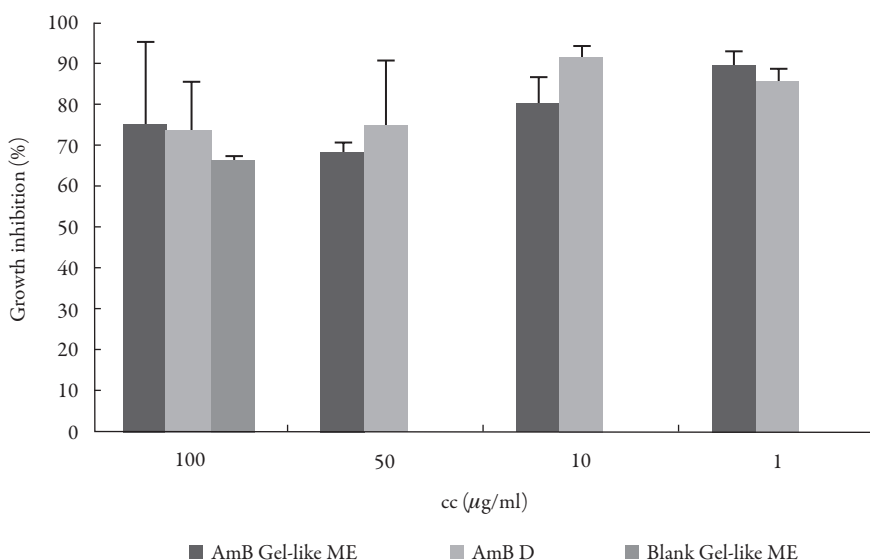


Figure 5. AmB-loaded gel-like ME *in vitro* inhibitory growth activity on *L. braziliensis* promastigotes.

Modern therapies aim to deliver drugs in target sites with few adverse effects, this becomes a difficult task when dealing with intracellular parasites as is the case of *Leishmania*, and therefore the carrier for the drug takes a very important role.

Skin irritation test

Cutaneous irritation of optimized formulation was tested using Draize test. Various degrees of irritation manifested by redness were observed showing a slight degree of irritation on rabbit skin although no oedema was observed (score: 2.08). The irritation responses were not homogenous across test animals. As shown in Figure 6 the maximum skin irritation was represented by moderate erythema, while some animals showed slight erythema. High surfactant concentrations and ethanol are known to be irritant, therefore the particular composition of this gel-like ME may be responsible for the observed effect on skin. Even considering this skin outcome, this novel formula has benefits concerning drug solubilization and pharmacological activity. An important fact to remark is that the drug did not reach the receptor compartment despite the formulation showing slight irritancy so AmB loaded gel-like ME could be safe for topical use.

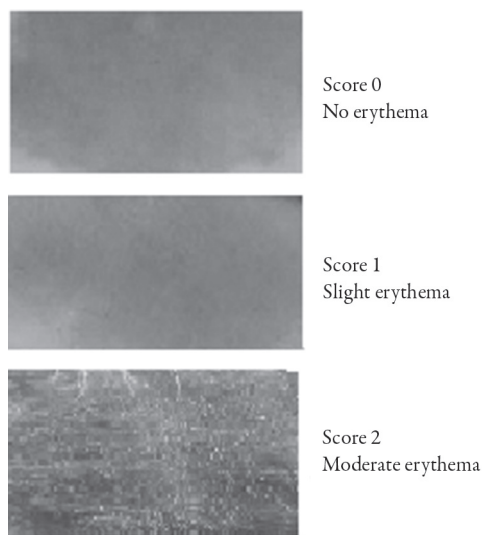


Figure 6. Photograph of skin irritation test with AmB-loaded gel-like ME carried out on rabbit skin.

CONCLUSION

A low cost gel-like ME of suitable viscosity for topical application was developed to deliver AmB. This novel formula was able to load a higher amount of AmB than drug solubility in water or several excipients and AmB remained stable for at least three months when stored in the fridge, as such, it could be used as a compounding formulation of AmB. Drug penetration into skin was significant so this AmB loaded gel-like ME is promising for the treatment of skin infections caused fungus and *Leishmania* parasites considering that there are few evidences of formulations that allow proper concentration of the drug within the skin after topical application. It would be of interest to further investigate this type of formulation by means of other techniques so as to provide details about its microstructure and also study its potential to be used as vehicle to solubilizing other drugs to be applied in the skin.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was financially supported with funds from Project UBACyT B003 from University of Buenos Aires. Authors thank PhD Rafael Ricco for his support in the obtention of phase-contrast images and Prof. PhD Emilio L. Malchiodi for his assistance with the antileishmanial *in vitro* assay.

REFERENCES

1. M.J. Lawrence, G.D. Rees, Microemulsion-based media as novel drug delivery systems, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **45**, 89 (2000).
2. M. Kreilgaard, Influence of microemulsions on cutaneous drug delivery, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **54**, Suppl 1, 77 (2002).
3. S. Talegaonkar, A. Azeem, F.J. Ahmad, R.K. Khar, S.A. Pathan, Z.I. Khan, Microemulsions: A novel approach to enhanced drug delivery, *Recent Pat. Drug Deliv. Formul.*, **2**(3), 238 (2008).
4. B. Rozman, M. Gasperlin, E. Tinois-Tessoneaud, F. Pirot, F. Falson, Simultaneous absorption of vitamins C and E from topical microemulsions using reconstructed human epidermis as a skin model, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **72**(1), 69 (2009).

5. L. Hua, P. Weisan, L. Jiayu, Z. Ying, Preparation, evaluation, and NMR characterization of vinpocetine microemulsion for transdermal delivery, *Drug Dev. Ind. Pharm.*, **30**(6), 657 (2004).
6. E. Peira, P. Scolari, M.R. Gasco, Transdermal permeation of apomorphine through hairless mouse skin from microemulsions, *Int. J. Pharm.*, **226**, 47 (2001).
7. Y.S. Rhee, J.G. Choi, E.S. Park, S.C. Chi, Transdermal delivery of ketoprofen using microemulsions, *Int. J. Pharm.*, **228**(1-2), 161 (2001).
8. E.-S. Park, S.-Y. Chang, M. Hahn, S.-C. Chi, Enhancing effect of polyoxyethylene alkyl ethers on the skin permeation of ibuprofen, *Int. J. Pharm.*, **209**, 109 (2000).
9. H.M. El-Laithy, K.M.F. El-Shaboury, The development of cutina lipogels and gel microemulsion for topical administration of fluconazole, *AAPS PharmSciTech*, **3**(4), 35 (2002).
10. A. Azeem, Z.I. Khan, M. Aquil, F.J. Ahmad, R.K. Khar, S. Talegaonkar, Microemulsions as surrogate carrier for dermal drug delivery, *Drug Dev. Ind. Pharm.*, **35**, 525 (2009).
11. W.K. Kegel, T.G. Overbeek, H.N.W. Lekkerkerker, Thermodynamics of Microemulsions I. In: "Handbook of Microemulsion Science and Technology", P. Kumar, K.L. Mittal (editors), Marcel Dekker, New York, 1999, Chapter 2, pp. 13-44.
12. S.C. Sharma, K. Tsuchiya, K. Sakai, H. Sakai, M. Abe, R. Miyahara, A narrow bicontinuous microemulsion domain in mixed polymeric silicone systems, *J. Oleo Sci.*, **57**(12), 669 (2008).
13. F. Podlogar, M. Gasperlin, M. Tomsic, A. Jamnik, M. Bester Rogac, Structural characterization of water-Tween40[®]/Inwitor 308[®]- isopropyl myristate microemulsion using different experimental methods, *Int. J. Pharm.*, **276**, 115 (2004).
14. M.A. Correa, M.V. Scarpa, M.C. Franzini, A.G. Oliveira, On the incorporation of the non-steroidal anti-inflammatory naproxen into cationic O/W microemulsions. *Colloids and Surfaces B*, **43**, 108 (2005).
15. T.P. Formariz, L.A. Chiavacci, V.H.V. Sarmiento, C.V. Santilli, E.S. Tabosa do Egito, A.G. Oliveira, Relationship between structural features and *in vitro* release of doxorubicin from biocompatible anionic microemulsion, *Colloids and Surfaces B*, **60**, 28 (2007).

16. M.J. Lawrence, G.D. Rees, Microemulsion-based media as novel drug delivery systems, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **45**, 89 (2000).
17. K. Trickett, J. Eastoe, Surfactant-based gels, *Adv. Colloid Interface Sci.*, **144**, 66 (2008).
18. M. Laupheimer, K. Jovic, F.E. Antunes, M. da G. Martins-Miguel, C. Stubenrauch, Studying orthogonal self-assembled systems: Phase behaviour and rheology of gelled microemulsions, *Soft Matter*, **9**, 3661 (2013).
19. A. Lemke, A.F. Kiderlen, O. Kayser, Amphotericin B, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **68**, 151 (2005).
20. N. Lincopani, E.M. Mamizukal, A.M. Carmona-Ribeiro, *J. Antimicrob. Chemother.*, **52**, 412 (2003).
21. R. Reithinger, J. Dujardin, C. Pirmez, B. Alexander, S. Brooker, Cutaneous leishmaniasis, *Lancet Infect. Dis.*, **7**(9), 581 (2007).
22. P. Minodiera, P. Parola, Cutaneous leishmaniasis treatment, *Travel. Med. Infect. Dis.*, **5**, 150 (2007).
23. K.M. Wasan, E.K. Wasan, P. Gershkovich, X. Zhu, R.R. Tidwell, K.A. Werbovetz, J.G. Clement, S.J. Thornton, Highly effective oral amphotericin B formulation against murine visceral leishmaniasis, *J. Infect. Dis.*, **200**, 357 (2009).
24. R.C. Zauli-Nascimento, D.C. Miguel, J.K.U. Yokoyama-Yasunaka, L.I.A. Pereira, M.A. Pelli de Oliveira, F. Ribeiro-Dias, M.L. Dorta, S.R.B. Uliana, In vitro sensitivity of *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* and *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis* Brazilian isolates to meglumine antimoniate and amphotericin B, *Trop. Med. Int. Health*, **15**, 68 (2010).
25. D. Vardy, Y. Barenholz, R. Cohen, A. Zvulunov, A. Biton, S. Klaus, S. Frankenburg, Topical amphotericin B for cutaneous leishmaniasis, *Arch. Dermatol.*, **135**, 856 (1999).
26. D. Vardy, Y. Barenholz, N. Naftoliev, S. Klaus, L. Gilead, S. Frankenburg, Efficacious topical treatment for human cutaneous leishmaniasis, *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*, **95**, 184 (2001).
27. A. Zvulunov, E. Cagnano, S. Frankenburg, Y. Barenholz, D. Vardy, Topical treatment of persistent cutaneous leishmaniasis with ethanolic lipid Amphotericin B, *Pediatr. Infect. Dis. J.*, **22**(6), 567 (2003).

28. A. Manosroi, L. Kongkaneromit, J. Manosroi, Stability and transdermal absorption of topical amphotericin B liposome formulations, *Int. J. Pharm.*, **270**(1-2), 279 (2004).
29. European Commission Scientific Committee on Consumer Products (SCCP) opinion on basic criteria for the *in vitro* assessment of dermal absorption of cosmetic ingredients, URL: http://ec.europa.eu/health/ph_risk/committees/04_sccp/docs/sccp_s_03.pdf, March 2006.
30. European Commission Health & Consumer Protection Directorate General Sanco/222/2000 Rev. 7 19 Guidance Document on Dermal Absorption, URL: http://www.efsa.europa.eu/cs/BlobServer/DocumentSet/SANCO_222_2000_rev7.pdf?ssbinary=true, March 2004.
31. N. Hasler-Nguyen, D. Shelton, G. Ponard, M. Bader, M. Schaffrik, P. Mallefet, Evaluation of the *in vitro* skin permeation of antiviral drugs from penciclovir 1% cream and acyclovir 5% cream used to treat herpes simplex virus infection, *BMC Dermatology*, **9**, 3 (2009).
32. National Committee for Clinical Laboratory Standards Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Approved standard M27-A2, 2nd ed. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa. 2002.
33. V.P. Sülsen, F.M. Frank, S.I. Cazorla, P. Barrera, B. Freixa, R. Vila, M.A. Sosa, E.L. Malchiodi, L.V. Muschietti, V.S. Martino, Psilostachyin C: A natural compound with trypanocidal activity, *Int. J. Antimicrob. Agents*, **37**, 536 (2011).
34. J.H. Draize, G. Woodward, H.O. Calvery, Methods for the study of irritation and toxicity of substances applied topically to the skin and mucous membranes, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **8**, 377 (1944).
35. D. Butani, C. Yewale, A. Misra, Amphotericin B topical microemulsion: Formulation, characterization and evaluation, *Colloids and Surfaces B*, **116**, 351 (2014).
36. K.C. Pestana, T.P. Formariz, C.M. Franzini, V.H.V. Sarmiento, L.A. Chiavacci, M.V. Scarpa, E.S.T. Egito, A.G. Oliveira, Oil-in-water lecithin-based microemulsions as potencial delivery system for amphotericin B, *Colloids and Surfaces B*, **66**, 253 (2008).
37. C. Salerno, S. Pérez, E. Monteagudo, A. Carlucci, C. Bregni, Solubility of amphotericin B in water-lecithin-dispersions and lecithin-based submicron emulsions, *Pak. J. Pharm. Sci.*, **26**(1), 189 (2013).

38. E. Esposito, F. Bortolotti, E. Menegatti, R. Cortesi, Amphiphilic association systems for Amphotericin B delivery, *Int. J. Pharm.*, **260**, 249 (2003).
39. A.M. Belloc, Effects of alcohol chain length and salt on phase behavior and critical phenomena in SDS microemulsions. In: "Handbook of Microemulsion Science and Technology", P. Kumar, K.L. Mittal (editors), Marcel Dekker, New York, 1999, Chapter 6, pp. 139-184.
40. R.M. Hathout, T.J. Woodman, S. Mansour, N.D. Mortada, A.S. Geneidi, R.H. Guy, Microemulsion formulations for the transdermal delivery of testosterone, *Eur. J. Pharm. Sci.*, **40**(3), 188 (2010).
41. <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5280965#section=Pharmacology-and-Biochemistry>, October 2015.
42. S. Espuelas, P. Legrand, P.M. Loiseau, C. Bories, G. Barrat, J.M. Irache, In vitro reversion of amphotericin B resistance in *Leishmania donovani* by Poloxamer 188, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **44**(8), 2190 (2000).
43. C.O. Rangel-Yagui, W.L. Hsu-Helen, L.R.S. Barbosa, C. Wilker, A. Pessoa, L.C. Tavares, R. Itri, Novel potential drug against *T. cruzi* and its interaction with surfactant micelles, *Pharm. Dev. Tech.*, **12**(2), 183 (2007).
44. G. Sánchez, D. Cuéllar, I. Zulantay, M. Gajardo, G.C. González-Martín, Cytotoxicity and trypanocidal activity of nifurtimox encapsulated in ethylcyanoacrylate nanoparticles, *Biol. Res.*, **35**(1), 39 (2002).
45. G. González-Martín, I. Merlino, M.N. Rodríguez-Cabezas, M. Torres, R. Núñez, A. Osuna, Characterization and trypanocidal activity of nifurtimox containing and empty nanoparticles of polyethylcyanoacrylates, *J. Pharm. Pharmacol.*, **50**(1), 29 (1998).
46. D. Dimitrijevic, A.J. Shaw, A.T. Florence, Effects of some non-ionic surfactants on transepithelial permeability in Caco-2 cells, *J. Pharm. Pharmacol.*, **52**(2), 157 (2000).

Estudio matemático de estabilidad del estado estacionario del desempeño del electrodo de la pasta de carbono, químicamente modificado por un líquido iónico, en la cuantificación del galato de propilo

Volodymyr V. Tkach^{1,2*}, Valdir Souza Ferreira², Reza Ojani³, Michel O. Galeano Espínola⁴, Petró I. Yagodynets¹, Márcia H. de Rizzo da Matta²

¹ Universidad Nacional de Chernivtsi, 58012. Calle de Kotsyubyns'ky, 2, Ucrania.

² Universidade Federal de Mato Grosso do Sul. Av. Sen. Felinto. Müller, 1555, C/P. 549, 79074-460, Campo Grande, MS, Brasil.

³ Universidad de Mazandarán. 3^{er} km. Ruta de Fuerzas Aéreas, 47416-95447, Babolsar, República Islámica de Irán.

⁴ Universidad Nacional de Asunción. 10,5 km. Ruta Mcal. Estigarribia, 3023, Ciudad Universitaria, San Lorenzo, Distrito Capital, República del Paraguay.

*Correo electrónico: nightwatcher2401@gmail.com.

Recibido para evaluación: 19 de febrero de 2015.

Aceptado para publicación: 5 de diciembre de 2015.

RESUMEN

El comportamiento y el desempeño electroquímico del electrodo de pasta de carbono químicamente modificado por un líquido iónico (EPCQM), en la detección del galato de propilo, se investigaron matemáticamente desde el punto de vista de la estabilidad del estado estacionario. El modelo matemático correspondiente se analizó por medio de la teoría de estabilidad lineal y análisis de bifurcaciones. Los resultados de modelaje son comparados con los experimentales (para este sistema y semejantes), bien como con los teóricos para otros casos.

Palabras clave: electrodos de pasta de carbono, líquidos iónicos, sensores electroquímicos, teoría de estabilidad lineal, análisis de bifurcaciones.

SUMMARY

Mathematical study on the steady state stability of performance of the carbon paste electrode, chemically modified by an ionic liquid, in the quantification of propyl gallate

The behavior and the electrochemical function of the carbon paste electrode, chemically modified by ionic liquid, have been investigated mathematically from the point of view of steady-state stability. The corresponding mathematical model is analyzed by linear stability theory and bifurcation analysis. The modeling results are being compared with experimental results (for this system and for the similar ones), and with theoretical results for other cases.

Key words: Carbon paste electrode, ionic liquids, electrochemical sensors, linear stability theory, bifurcation analysis.

INTRODUCCIÓN

El galato de propilo, es decir, 3,4,5-tri-hidroxibenzoato de propilo, es un antioxidante usado en industrias de alimentos desde los años 1940, para prevenir la oxidación de aceites y grasas, y así prolongar la “vida útil” de los alimentos [1, 2]. Su código internacional de clasificación es E310. También es usado para el *quenching* en espectrometría de fluorescencia, en industria de tintas, en la producción de biodiésel y como ingrediente farmacéutico activo.

A pesar de su uso frecuente en la industria, no es recomendada su aplicación en productos que requieran el empleo del horno [3]. Otro estudio mostró también su acción antagonista a estrógenos [4], dependiente de su concentración en el organismo. Ello hace que sea importante desarrollar un método preciso, exacto y rápido de su detección [5-7].

Anteriormente, se describieron varios métodos para la detección de E310, mediante el empleo de fluorescencia [8], cromatografía [5, 9], electroforesis [10] y otros métodos [11]. Estos métodos, a pesar de su posible eficiencia, tenían desventajas como respuesta difícil de interpretar, lentitud, influencias fuertes del medio de reacción, etc., y los métodos electroquímicos ofrecerían solución a los mencionados problemas [12-14].

Una de las herramientas modernas en el análisis electroquímico es el uso de los electrodos de pasta de carbono, cuyo primer uso lo dio Adams en 1958 [15]. Las ventajas electroanalíticas de electrodos de pasta de carbono son la rapidez de su preparación

y diseño, facilidad de su modificación y eficiencia y claridad de su respuesta electroquímica [16-30], pudiendo ser modificados por diferentes sustancias activas (líquidos iónicos, derivados ferrocénicos, nanopartículas, nanotubos y hasta con la cáscara de plátano). El desempeño semejante también tiene otra clase de materiales novedosos, que son los polímeros conductores (PC) [31-40]. Uno de los problemas de su utilización es la dificultad en la detección del mecanismo concreto de la oxidación e inestabilidades electroquímicas, cuya ocurrencia es posible no solo para el desempeño de los sensores electroquímicos, en particular [31-33], sino también para la oxidación de compuestos orgánicos e hidrógeno, en general [41-50] (incluyendo la electropolimerización de compuestos heterocíclicos).

Como la explicación fenomenológica, que siempre se daba a tales fenómenos, no tiene argumentos fundamentales y rígidos; un modelo matemático capaz de describir su comportamiento y explicarlos de forma exacta, da información importante para la detección del mecanismo concreto de desempeño de electrodos, contribuyendo no solo para la descripción de un sensor concreto, sino también para los semejantes. Otro uso del modelo matemático es la comparación del sistema concreto con los otros (usando sus modelos y los resultados de su análisis).

En el artículo [30] ha sido descrito el sensor electroquímico de galato de propilo, basado en el electrodo de pasta de carbono, modificado por un líquido iónico, basado en imidazol. El presente trabajo continúa el estudio comenzado en el mencionado artículo, se ofrece el modelo matemático para el proceso del desempeño y, mediante este modelo, se compara con los correspondientes al desempeño de polímeros conductores [51-60], ferroceno [61, 62] y nanopartículas de cobre (II) [63]. Es posible también comparar el sistema con los de electropolimerización, matemáticamente descritos en [64-70].

EL SISTEMA Y SU MODELO

Antes de introducir el modelo, es preciso describir unas observaciones acerca del propio proceso de la oxidación electroquímica del éster (analito) y del comportamiento del líquido iónico usado.

El analito tiene tres grupos de hidroxilos; dos pueden ser oxidados, formando el sistema quinónico, y dos protones, siguiendo el esquema general:



Es preciso subrayar también que las propiedades ácidas del hidrógeno de hidroxilo, vecino al sistema quinónico, son más fuertemente expresas que en el caso de hidroxilo

fenólico (por cuenta de la formación del sistema análogo al del ácido triangular —deltaico—, cuadrático —escuárico— y tetra-hidroxi-quinona).

Imidazol es uno de los compuestos heterocíclicos, llamados diazoles, cuyas propiedades anfotéricas son explicadas por la presencia de dos heteroátomos de nitrógeno de diferentes configuraciones (pirólico y piridínico), siendo un ácido más fuerte que el pirrol y una base más fuerte que su isómero pirazol y piridina, lo que hace su comportamiento dependiente del potencial de hidrógeno. Como tiene un sistema aromático conjugado, en el sensor desempeña la función de mediador de transferencia de electrones y como sustancia activa:



Se puede concluir que, contrariamente al comportamiento de los compuestos ferrocénicos neutros, el comportamiento de este sensor va a depender del pH y, en este orden de ideas, se utilizarán tres variables para describir el comportamiento del sensor:

c – la concentración del analito en la capa presuperficial;

θ – el grado de recubrimiento del electrodo por la forma modificada;

h – la concentración de los protones en la capa presuperficial.

Para simplificar el modelo, evitando la aparición de ecuaciones diferenciales complejas, suponemos que la solución se esté agitando intensamente (lo que da posibilidad de menospreciar el flujo de convección), de que el electrólito soporte esté en exceso (lo que da posibilidad de menospreciar el flujo de migración). También es supuesto que el perfil de concentraciones de analito y protones en la capa presuperficial sea lineal y el espesor de la propia capa sea constante e igual a δ .

El analito entra en la capa presuperficial, mediante su difusión, pudiendo reaccionar con los protones y ser oxidado con la formación del nuevo ácido. En este orden de ideas, la ecuación de balance de su concentración será descrita como:

$$\frac{dc}{dt} = \frac{2}{\delta} \left(\frac{D}{\delta} (c_0 - c) - r_H - r_1 \right) \quad (4)$$

Siendo D su coeficiente de difusión, c_0 su concentración en la zona interior de la solución, r_H la velocidad de la reacción de analito con los protones y r_1 la velocidad de su oxidación hasta la forma quinónica.

El líquido iónico es modificado por medio de su participación en la oxidación de analito y por medio de su reacción por protones. Esta forma después sigue siendo oxidada, terminando la transferencia de electrones. Así puesto, la ecuación de balance de su concentración superficial (expresa en la forma de grado de recubrimiento), será presentada en la forma de:

$$\frac{d\theta}{dt} = \frac{2}{\Gamma}(r_1 + r_{H_2} - r_2) \quad (5)$$

en la que Γ es la concentración máxima del líquido iónico sobre la pasta de carbono, r_{H_2} la velocidad de la posible reacción de líquido iónico con los protones, r_2 la velocidad de su oxidación.

Los protones entran en la capa presuperficial mediante su difusión de la zona interior de la solución, siendo capaces de aparecer tanto en la reacción (2), que en este caso podrá ser descrita como:



como en la reacción (3), lo que hace la cinética diferente de los casos descritos en [51-63]. Desaparecen de la capa en las reacciones con el analito y con el líquido iónico. Como se trata de un modelo generalista, los dos casos (cuya realización depende del medio de reacción) serán descritos y así, su ecuación de balance será descrita como:

$$\frac{dh}{dt} = \frac{2}{\delta} \left(\frac{\Delta}{\delta} (h_0 - h) + r_1 + r_2 - r_{H_2} - r_H \right) \quad (6)$$

En la que Δ es su coeficiente de difusión, h_0 es la concentración de protones en la zona interior de la solución.

Las velocidades de los respectivos procesos se podrán calcular así:

$$r_1 = k_1 c (1 - \theta), r_2 = k_2 \theta \exp\left(\frac{nF\varphi_0}{RT}\right), r_H = k_H c h, r_{H_2} = k_1 h (1 - \theta) \quad (7-10)$$

Los parámetros k son las constantes de las respectivas velocidades, n el número de electrones transferidos, F el valor de la constante de Faraday, R la constante universal de gases, T la temperatura absoluta del ambiente y φ_0 el salto de potencial, relativo al potencial de carga cero.

Siendo un sistema semejante a los observados en [16-40], según el tercer teorema de semejanza, deberá describirse por el conjunto de ecuaciones semejante al vigente, pero diferente en algunos detalles. Estas diferencias, como la relación entre la parte experimental y la teórica, serán discutidas en la próxima sección.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para investigar el comportamiento del sistema con la electrodetección del galato de propilo por el electrodo de pasta de carbono, modificado por un líquido iónico derivado de imidazol, necesitamos analizar el conjunto de ecuaciones (4-6) mediante la teoría de estabilidad linear. La matriz funcional de Jacobi, cuyos elementos son calculados para el estado estacionario, se puede describir como:

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

en la que:

$$\begin{aligned} a_{11} &= \frac{2}{\delta} \left(-\frac{r_H}{c} - \frac{r_1}{c} - \frac{D}{\delta} \right); \quad a_{12} = \frac{2}{\delta} \left(\frac{r_1}{1-\theta} \right); \quad a_{13} = \frac{2}{\delta} \left(-\frac{r_H}{b} \right); \\ a_{21} &= \frac{1}{\Gamma} \left(\frac{r_1}{c} \right); \quad a_{22} = \frac{1}{\Gamma} \left[-\frac{r_1}{1-\theta} - \frac{r_{H_2}}{1-\theta} - k_2 \exp \left(\frac{nF\varphi_0}{RT} \right) - \alpha k_2 \theta \exp \left(\frac{nF\varphi_0}{RT} \right) \right]; \\ a_{23} &= \frac{1}{\Gamma} \left(\frac{r_{H_2}}{b} \right); \\ a_{31} &= \frac{2}{\delta} \left(-\frac{r_H}{c} \right); \quad a_{32} = \frac{1}{\delta} \left[-\frac{r_1}{1-\theta} + k_2 \exp \left(\frac{nF\varphi_0}{RT} \right) + \alpha k_2 \theta \exp \left(\frac{nF\varphi_0}{RT} \right) - \frac{r_{H_2}}{1-\theta} \right]; \\ a_{33} &= \frac{2}{\delta} \left(-\frac{r_H}{b} - \frac{r_{H_2}}{b} - \frac{\Delta}{\delta} \right); \end{aligned} \quad (12-20)$$

Para simplificar el análisis del modelo, introducimos las nuevas variables, de modo que el determinante de la matriz se describe como:

$$\frac{4}{\Gamma \delta^2} \begin{vmatrix} -\kappa_1 - X - I & \Theta & \Lambda \\ X & -\Theta - \Pi - \Sigma & \ddot{Y} \\ -I & -\Theta + \Pi - \Sigma & -\Lambda - \ddot{Y} - \kappa_2 \end{vmatrix} \quad (21)$$

La inestabilidad oscilatoria, cuya aparición acontece en las condiciones de bifurcación de Hopf, es posible para este sistema, como para los semejantes. En términos simples, la condición se realiza en el caso de haber elementos positivos en la diagonal principal de la matriz. Como en los sistemas [51-63], el único elemento de la diagonal, capaz de ser positivo, es $-\Sigma$, que describe las influencias del proceso electroquímico sobre las capacitancias y cargas de la doble capa eléctrica (DCE). En ausencia del comportamiento electrocatalítico, es el único factor responsable por la posible aparición del comportamiento oscilatorio en este sistema. Ya la amplitud y frecuencia de oscilaciones se harán en dependencia de la composición de la solución del electrólito.

La estabilidad del estado estacionario. Utilizando el criterio de Routh-Hurwitz y la inecuación $\text{Det } J < 0$, que se infiere de sus condiciones, se podrá obtener el requisito de estabilidad del estado estacionario para este sistema. Resuelta la inecuación (21) < 0 , relativamente al parámetro de difusión del analito κ_1 , este requisito se obtendrá en la forma de:

$$-\kappa_1 < \frac{X(\Theta\Lambda - \Pi\Lambda + \Sigma\Lambda + \Theta\ddot{Y} + \Theta\kappa_2) - I(\Theta\ddot{Y} + \Theta\Lambda + \Pi\Lambda + \Sigma\Lambda)}{\Theta\Pi + \Pi\Lambda + \Sigma\Lambda + \Theta\ddot{Y} + \Sigma\ddot{Y} + \Theta\kappa_2 + \Pi\kappa_2 + \Sigma\kappa_2} + X + I \quad (22)$$

Se puede ver que la región de la respuesta clara del sensor es amplia, solo pudiendo ser “recortada” por las influencias del proceso electroquímico a las capacitancias y cargas de doble capa eléctrica (DCE), descritas por alto valor negativo del criterio Σ . Es esta la región del trecho lineal de la curva “parámetro electroquímico-concentración”. La estabilidad del estado estacionario (y en consecuencia, el desempeño estable y sensible del sensor en general), en ausencia de reacciones laterales, se controlará por la difusión del analito.

Mientras tanto, se puede ver que el alto valor del parámetro Π , responsable por la reacción de protones y el parámetro κ_2 , responsable por su difusión, disminuyen las tendencias de estabilidad del estado estacionario (especialmente del estado estacionario “ciclado” por las reacciones del analito). Así se puede confirmar que el valor reducido del pH no contribuirá con la estabilidad del estado estacionario, pero sí dará malas influencias a la precisión del sensor. Esto concuerda no solo con lo observado experimentalmente en [30], sino también con los resultados teóricos, descritos en [51-63], salvo el desempeño del electrodo ferrocénico no derivatizado con los analitos, cuya oxidación no depende del potencial de hidrógeno.

Es preciso observar que en el medio alcalino, la base también reaccionaría con el éster formando sal del ácido gálico, bien como con el líquido iónico (también forma su propia sal y derivado del catión imidazólico). Así, en medio alcalino, el desempeño

del sensor también sería influenciado de forma negativa, pero de modo desigual al del medio ácido. Así, la curva pH-pico del parámetro electroquímico tendrá valor máximo en el valor del pH, igual a 7, observado experimentalmente, pero de manera contraria a lo observado para algunos casos en polímeros conductores (como se ve experimentalmente en [40] y descrito de manera teórica en [60]); la expresión de la curva es más próxima de simetría que en el caso mencionado de la detección de omeprazol, a pesar de que este sea un compuesto de naturaleza semejante a la del líquido iónico usado (en aquel caso se usó la polializarina como polímero conductor). El modelo para la función electroanalítica de tales sensores en medio alcalino será uno de los próximos pasos de esta investigación.

La inestabilidad monotónica ocurre en el valor crítico del parámetro de difusión, sirviendo de “margen” entre los estados estacionarios estables y los estados inestables. Su condición de aparición es la siguiente:

$$-\kappa_1 = \frac{X(\Theta\Lambda - \Pi\Lambda + \Sigma\Lambda + \Theta\Lambda + \Theta\ddot{Y} + \Theta\kappa_2) - I(\Theta\ddot{Y} + \Theta\Lambda + \Pi\Lambda + \Sigma\Lambda)}{\Theta\Pi + \Pi\Lambda + \Sigma\Lambda + \Theta\ddot{Y} + \Sigma\ddot{Y} + \Theta\kappa_2 + \Pi\kappa_2 + \Sigma\kappa_2} + X + I \quad (23)$$

En este valor, para el sistema coexisten varios estados estacionarios (siendo cada uno inestable), y solo escoge uno. Este se destruye, cuando se alteran las condiciones.

Autocatálisis. En este caso, el modelo está siendo alterado, conforme lo mostrado, por ejemplo, en [50] o [51]. Como ya se mencionó, la autocatálisis será otra causa del comportamiento oscilatorio en este sistema (como en los semejantes) [51-63], y también en algunos ejemplos de otros sistemas, descritos en [64-70].

La presencia de otras sustancias que puedan intervenir en el proceso, puede ser descrita por un modelo análogo al presentado en este trabajo (alterando algunas condiciones cinéticas), siendo, según las observaciones hechas en el modelo, posible prever la dependencia entre su presencia y el desempeño del sensor, tomando en cuenta apenas las condiciones de estabilidad y las propiedades químicas de la sustancia (y los ensayos experimentales solo serán útiles para confirmar las propiedades electroanalíticas de un sistema teórico).

CONCLUSIONES

El líquido iónico, basado en imidazol, puede funcionar como mediador en el sensor electroquímico del galato de propilo, pues consigue desempeñar la transferencia de electrones o protones del sistema analítico para el sistema transductor. Sus propiedades

son explicadas por su sistema conjugado y presencia de dos átomos de nitrógeno de estructura diferente.

El estado estacionario se mantiene estable, si no hay influencias fuertes del proceso electroquímico a las capacitancias y cargas de la doble capa. En ausencia de las reacciones laterales y sustancias que intervengan en el proceso analítico, la estabilidad del estado estacionario será controlada por la difusión. Las reacciones laterales tienden a desordenar la respuesta del sensor y contribuyen negativamente a la estabilidad del estado estacionario.

Generalmente, la influencia de la presencia de sustancias que intervienen en el desempeño del sensor es desigual, pero en la cuestión del pH, la curva pH-parámetro electroquímico del pico debe presentar el pico en el valor del pH, igual a 7, pero más próximo de la simetría, que en el caso de los polímeros conductores.

Las inestabilidades monotónica y oscilatoria para este sistema son posibles, siendo causadas por influencias fuertes del proceso electroquímico sobre capacitancias y cargas de la doble capa eléctrica. Otra causa puede ser el autocatálisis (si lo hay).

De esta manera, es posible la existencia de estructuras disipativas temporales, que se mantienen por la difusión del analito y por la formación de la forma final del líquido iónico.

REFERENCIAS

1. http://www.nlm.nih.gov/cgi/mesh/2006/MB_cgi?mode=&term=Propyl+Gallate, consultado el 7 de febrero de 2015.
2. J. Widergen, A. Chmyrov, C. Eggeling *et al.*, Strategies to improve photostabilities in ultrasensitive fluorescence spectroscopy, *J. Phys. Chem.*, **111**, 429 (2007).
3. [No authors listed], Final report on the amended safety assessment of propyl gallate, *Int. J. Toxicol.*, **26**, 89 (2007).
4. A. Adamasi, A. Mozzarelli, C. Meda *et al.*, Identification of xenoestrogens in food additives by an integrated in silico and in vitro approach, *Chem. Res. Toxicol.*, **22**, 52 (2009).
5. A. Alnokkari, M. Ataie, M. Rajab, Z. Alassaf, Determination of propyl gallate in some vegetable oil samples by thin layer chromatography - image analysis method, *Int. J. Pharm. Sci.*, **26**, 268 (2014).
6. F. Aguilar, R. Crebelli, B. Dusemund *et al.*, Scientific opinion on the re-evaluation of propyl gallate (E310) as a food additive. EFSA Panel on Food Additives

- and Nutrient Sources added to Food (ANS), *EFSA J.*, **12**, 3642 (2014), URL: <http://www.efsa.europa.eu/it/efsajournal/doc/3642.pdf>, consultado el 7 de febrero de 2015.
7. M. Debbab, S. El-Hajjaji, A.H. Aly *et al.*, Cypermethrin residues in fresh vegetables: Detection by HPLC and LCESIMS and their effect on antioxidant activity, *Mater. Environ. Sci.*, **5**, 2257 (2014).
8. J.Y. Wang, H.L. Wu, Y. Chen *et al.*, Quantitative determination of butylated hydroxyanisole and n-propyl gallate in cosmetics using three-dimensional fluorescence coupled with second-order calibration, *Talanta*, **116**, 347 (2013).
9. N. Pedije, Perkin Elmer Inc., URL: http://www.perkinelmer.com/pdfs/downloads/app_antioxidantsinedibleoilbyuhplc.pdf, consultado el 7 de febrero de 2015.
10. Q. Xiang, Y. Gao, Y. Xu, E. Wang, Capillary electrophoresis-amperometric determination of antioxidant propyl gallate and butylated hydroxyanisole in foods, *Anal. Sci.*, **23**, 713 (2007).
11. S. Panadero, A. Gómez-Hens, D. Pérez-Bendito, Stopped flow kinetic determination of nalidixic acid and norfloxacin based on lanthanide-sensitized fluorescence, *Analyst*, **120**, 125 (1995).
12. Y. Ni, L. Wang, S. Kokot, Voltammetric determination of butylated hydroxyanisole, butylated hydroxytoluene, propyl gallate and tbutylhydroquinone by use of chemometric approaches, *Anal. Chim. Acta*, **412**, 185 (2000).
13. G. Xu, Y. Chi, L. Li *et al.*, Imprinted propyl gallate electrochemical sensor based on graphene/single walled carbon nanotubes/sol-gel film, *Food Chem.*, **177**, 37 (2015).
14. Y.-M. Choong, H.-J. Lin., A rapid and simple gas chromatographic method for direct determination of saffrole in soft drinks, *J. Food Drug Anal.*, **9**, 27 (2001).
15. R.N. Adams, Carbon paste electrodes, *Anal. Chem.*, **30**, 1576 (1958).
16. G.L. Luque, M.C. Rodríguez, G.A. Rivas, Glucose biosensors based on the immobilization of copper oxide and glucose oxidase within a carbon paste matrix, *Talanta*, **66**, 467 (2005).
17. R. Ojani, J.B. Raoof, S.R. Hosseini, Electrocatalytic oxidation of methanol on carbon paste electrode modified by nickel ions dispersed into poly(1,5-diaminonaphthalene) film, *Electrochim. Acta*, **23**, 2402 (2008).

18. R. Ojani, J.B. Raoof, P.S. Afagh, Electrocatalytic oxidation of some carbohydrates by poly(1-naphthylamine)/nickel modified carbon paste electrode, *J. Electroanal. Chem.*, **571**, 1 (2004).
19. R. Ojani, J.B. Raoof, A. Ahmady, S.R. Hosseini, Highly improved methanol oxidation onto carbon paste electrode, modified by poly(2,5-dimethylaniline), *Casp. J. Chem.*, **2**, 45 (2013).
20. J.B. Raoof, R. Ojani, S. Rashid-Nadimi, Voltammetric determination of ascorbic acid and dopamine in the same sample at the surface of a carbon paste electrode modified with polypyrrole/ferrocyanide films, *Electrochim. Acta*, **50**, 4694 (2005).
21. S.B. Hocevar, I. Svancara, K. Vytras, B. Ogorevc, Novel electrode for electrochemical stripping, based on carbon paste, modified with bismouth powder, *Electrochim. Acta*, **51**, 6 (2005).
22. H. Beitollahi, S. Tajik, M.H. Asadi, P. Biparva, Application of a modified graphene nanosheet paste electrode for voltammetric determination of methyl dopa in urine and pharmaceutical formulation, *J. Anal. Sci. Tecn.*, **5**, 29 (2014).
23. S. Tajik, M. Ali-Taher, H. Beitollahi, First report for electrochemical determination of levodopa and cabergoline: Application for determination of levodopa and cabergoline in human serum, urine and pharmaceutical formulations, *Electroanal.*, **796**, 26 (2014).
24. M.M. Foroughi, H. Beitollahi, S. Tajik *et al.*, Hydroxylamine electrochemical sensor based on a modified carbon nanotube paste electrode: Application to determination of hydroxylamine in water samples, *Int. J. Electrochem.*, **9**, 2955 (2014).
25. M.M. Foroughi, H. Beitollahi, S. Tajik *et al.*, Electrochemical determination of N-acetylcysteine and folic acid in pharmaceutical and biological samples using a modified carbon nanotube paste electrode, *Int. J. Electrochem.*, **9**, 8407 (2014).
26. Ch. Li., Voltammetric determination of ethinylestradiol at a carbon paste electrode in the presence of cetyl pyridine bromine, *Bioelectrochem.*, **70**, 263 (2007).
27. Ch.C. Vishwanath, B.E. Kumara-Swamy, Electrochemical studies of paracetamol at poly (anilineblue) modified carbon paste electrode: A voltammetric study, *Anal. Bioanal. Electrochem.*, **5**, 573 (2014).
28. S.E. Baghamidi, 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.*, **5**, 634 (2014).

29. J.B. Raoof, A. Kiani, R. Ojani, R. Valliolahi, Electrochemical determination of dopamine using banana-MWCNTs modified carbon paste electrode, *Anal. Bioanal. Electrochem.*, **3**, 59 (2011).
30. L.H. de Oliveira, A.C. Dias Souza, L. Pizzuti *et al.*, Determinação voltamétrica do antioxidante galato de propila em biodiesel empregando eletrodos de pasta de carbonomodificados com líquido iônico, *Orbital Elec. J. Chem.*, **6**, 255 (2014).
31. R. Singh, Prospects of organic conducting polymer modified electrodes: Enzymosensors, *Int. J. Electrochem.*, N 502707 (2012).
32. O. Korostynska, K. Arshak, E. Gill, A. Arshak, Review on state-of-the-art in polymer based pH sensors, *Sensors*, **7**, 3027 (2008).
33. M. Gholami, M. Rezayi, P.M. Nia *et al.*, A novel method for fabricating Fe²⁺ ion selective sensor using polypyrrole and sodium dodecyl sulfate based on carbon screen-printed electrode, *Measurement*, **69**, 115 (2015).
34. R. Ojani, J.-B. Raoof, A.A. Maleki, S. Safshekan, Simultaneous and sensitive detection of dopamine and uric acid using a poly(L-methionine)/gold nanoparticle-modified glassy carbon electrode, *Chin. J. Cat.*, **35**, 423 (2014).
35. J.W. Park, S.J. Park, O.S. Kwon *et al.*, High-performance Hg(2+) FET-type sensors based on reduced graphene oxide-polyfurannanohybrids, *Analyst*, **139**, 3852 (2014).
36. H. Shu, "Applications of poly(3-hexylthiophene) thin film as a hydrazine-sensitive chemoresistor", M. Sc. Thesis, Alburn, Alabama, 2006.
37. S. Lee, B.-J. Yi, K.-Y. Chun *et al.*, Chitosan-polypyrrole fiber for stain sensor, *J. Nanosci., Nanotechnol.*, **15**, 2537 (2015).
38. L. Wang, H. Xu, Y. Song *et al.*, Carbon fiber ultramicrodic electrode electrode-deposited with over-oxidized polypyrrole for amperometric detection of vesicular exocytosis from pheochromocytoma cell, *Sensors*, **15**, 868 (2015).
39. J. Li, X. Li, Y. Zhang *et al.*, Electrochemiluminescence sensor based on cationic polythiophene derivative and NH₂-graphene for dopamine detection, *RSC Adv.*, **5**, 5432 (2015).
40. K.R. Mantesha, B.E. Kumara-Swamy, K. Vasantakumar-Pai, Poly(alizarin) modified glassy carbon electrode for the electrochemical investigation of omeprazole: A voltammetric study, *Anal. Bioanal. Electrochem.*, **6**, 234 (2014).

41. L. Hudson, M.R. Bassett, Oscillatory electrodisolution of metals, *Rev. Chem. Eng.*, **7**, 108 (1991).
42. M. Pagitsas, S. Dimitra, The improved Franck-FitzHugh model for the electrodisolution of iron in sulphuric acid solutions: Linear stability and bifurcation analysis. Derivation of the kinetic equations for the forced Franck-FitzHugh model, *Electrochim. Acta*, **36**, 1301 (1991).
43. A.J. Pearlstein, J.A. Johnson, Global and conditional stability of the steady and periodic solutions of the Franck-FitzHugh model of electrodisolution of Fe in H_2SO_4 , *J. Electrochem. Soc.*, **136**, 1290 (1991).
44. I. Das, N.R. Agrawal, S.A. Ansari, S.K. Gupta, Pattern formation and oscillatory polymerization of thiophene, *Ind. J. Chem.*, **47**, 1798 (2008).
45. S.U. Rahman, M.S. Ba-Shammakh, Thermal effects on the process of electropolymerization of pyrrole on mild steel, *Synth. Met.*, **140**, 207 (2004).
46. A.S. Liu, M.A.S. Oliveira, Electrodeposition of polypyrrole films on aluminium from tartrate aqueous solution, *J. Braz. Chem. Soc.*, **18**, 143 (2007).
47. D. Sazou, The dynamic behavior of the electrochemical polymerization of indole in acetonitrile-water mixtures, *Synth. Met.*, **130**, 45 (2002).
48. I. Das, N. Goel, N.R. Agrawal, S.K. Gupta, Growth patterns of dendrimers and electric potential oscillations during electropolymerization of pyrrole using mono- and mixed surfactants, *J. Phys. Chem.*, **114**, 12888 (2010).
49. M. Bazzaoui, E.A. Bazzaoui, L. Martins, J.I. Martins, Electropolymerization of pyrrole on zinc-lead-silver alloys' electrodes in neutral and acid organic media, *Synth. Met.*, **130**, 73 (2002).
50. I. Das, N. Goel, S.K. Gupta, N.R. Agrawal, Electropolymerization of pyrrole: Dendrimers, nano-sized patterns and oscillations in potential in presence of aromatic and aliphatic surfactants, *J. Electroanal. Chem.*, **670**, 1 (2012).
51. V. Tkach, V. Nechyporuk, P. Yagodynets, A investigação matemática do desempenho de biossensores eletroquímicos enzimáticos, baseados nos polímeros condutores, *Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm.*, **41**, 203 (2012).
52. 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).

53. 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).
54. V. Tkach, V. Nechyporuk, P. Yagodynets', A descrição matemática do processo da detecção de duas substâncias com um grupo funcional comum pelos sensores e biossensores eletroquímicos baseados nos polímeros condutores, *Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm.*, **42**, 215 (2013).
55. V. Tkach, V. Nechyporuk, P. Yagodynets', I. Rusnak, The CP-based electrochemical biosensors with autocatalytic stage in their function and the mathematical description of their work, *Orbital Elec. J. Chem.*, **4**, 136 (2012).
56. V. 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).
57. V. Tkach, H. Nascimento, V. Nechyporuk, P. Yagodynets', A descrição matemática do desempenho de sensores e biossensores eletroquímicos de pH, baseados em polímeros condutores, nos processos de medição do pH dos líquidos de cavidade bucal no modo de voltagem constante, *Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm.*, **43**, 196 (2014).
58. V. Tkach, R. Ojani, S.C. de Oliveira *et al.*, The mathematical description for the hydrazine detection by Michael reaction with naphtholaminosulphonic acids, *Anal. Bioanal. Electrochem.*, **7**, 291 (2015).
59. V. Tkach, B. Kumara-Swamy, R. Ojani *et al.*, O comportamento de paracetamol durante a sua oxidação eletrocatalítica sobre poli(azul da anilina) e a sua descrição matemática, *Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm.*, **44**, 148 (2015).
60. V. Tkach, B. Kumara-Swamy, R. Ojani *et al.*, 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).
61. V. Tkach, R. Ojani, V. Nechyporuk, P. Yagodynets', Modelagem matemática do desempenho de eletrodos, 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).
62. V. Tkach, S. Tajik, R. Ojani *et al.*, Mecanismo de desempenho eletroanalítico da 2,7-bis(ferrocenil-etinil)-fluoreno-9-ona para eletrodetecção da hidrazina e sua descrição matemática, *Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm.*, **44**, 208 (2015).

63. V. Tkach, R. Ojani, V. Nechyporuk, P. Yagodynets', A Descrição matemática do desempenho eletroanalítico de nanopartículas de óxido de cobre(II) na eletrode-
tecção de hidrazina, *Orbital. Elec. J. Chem.*, **6**, 142 (2014).
64. V. Tkach, V. Nechyporuk, P. Yagodynets', The mathematical description for the
electropolymerization of furan, pyrrole and thiophene derivatives in alkaline
media, *Med. J. Chem.*, **3**, 1122 (2015).
65. V.V. Tkach, V.V. Nechyporuk, P.I. Yagodynets', O estudo de estabilidade do pro-
cesso da eletropolimerização de pirróis N-substituídos, *Proc. Quím.*, **8**, 49 (2014).
66. V.V. Tkach, V.V. Nechyporuk, P.I. Yagodynets', Eletropolimerização dos compos-
tos heterocíclicos. Modelos matemáticos, *Ciêñ. Tecn. Mat.*, **24**, 54 (2012).
67. V. Tkach, V. Nechyporuk, P. Yagodynets', Aseleto polimerizações galvanostática
e potenciodinâmica (em voltagem constante) dos compostos heterocíclicos e a
sua descrição matemática, *Tecn. Met. Mat. Min.*, **10**, 249 (2013).
68. V. Tkach, V. Nechyporuk, P. Yagodynets', Estudio matemático de las condiciones
de estabilidad en la polimerización electroquímica de compuestos heterocíclicos
en presencia de oxidantes, *Afinidad*, **70**, 73 (2013).
69. V.V. Tkach, V.V. Nechyporuk, P. Yagodynets', M. Hryhoryak, A investigação do
comportamento eletroquímico durante a síntese eletroreduativa de polímeros
condutores na presença de catiões dos metais, *Ciêñ. Tecn. Mat.*, **24**, 50 (2012).
70. V.V. Tkach, V.V. Nechyporuk, O.T. Slipenyuk, A descrição matemática do fenô-
meno oscilatório durante a síntese eletroquímica dos filmes de oxi-hidroxi com-
postos de cobalto (III) e durante síntese dos compósitos deles com polímeros
condutores, *Ecl. Quím.*, **37**, 74 (2012).

Economic impact of vaccination with PCV13 vs. vaccination with PCV 10 in Colombia

Jorge Díaz¹, José Urrego², Alexander Moreno³, Juan Reyes⁴, Fernando Peralta⁵, Víctor Prieto⁶, Paul Brown⁷

¹ Universidad Nacional de Colombia, Bogotá Campus, Faculty of Sciences, Department of Pharmacy. Carrera 30 No. 45-03, Bogotá, Colombia. E-mail: jadiazr@unal.edu.co.

² Universidad de Ciencias Aplicadas y Ambientales, Bogotá Campus, Faculty of Health Sciences. Calle 222 No. 55-37, Bogotá, Colombia. E-mail: joseurregon@gmail.com.

³ Universidad Distrital Francisco José de Caldas, Faculty of Engineering. Carrera 8 No. 40-62, Bogotá, Colombia, ZIP Code 111321. E-mail: ingindmoreno@gmail.com.

⁴ Pfizer. Avenida Suba 95-66, Bogotá, Colombia. E-mail: JuanManuel.Reyes@pfizer.com.

⁵ Universidad Nacional de Colombia, Bogotá Campus, School of Medicine, Instituto de Investigaciones Clínicas. Carrera 30 No. 45-03, Bogotá, Colombia. E-mail: fperaltap@unal.edu.co.

⁶ Pfizer, Avenida Suba 95-66, Bogotá, Colombia. E-mail: VictorAlfonso.Prieto@pfizer.com.

⁷ University of California, Merced, Health Science Research Institute, 5200 North Lake Road, Merced, CA 95343, USA. E-mail: pbrown3@ucmerced.edu.

Recibido para evaluación: 21 de febrero de 2015.

Aceptado para publicación: 10 de diciembre de 2015.

SUMMARY

We aim was to estimate the difference of costs and expected cases from serotype coverage of the 13-valent pneumococcal conjugated vaccine (PCV13) and 10-valent pneumococcal conjugated vaccine (PCV10) in the population under 5 years of age in Colombia, using a deterministic model. We considered the probabilities of incidence, mortality and sequelae from infections of pneumonia, meningitis, sepsis and acute otitis media, as well as the clinical effectiveness of PCV13 and PCV10, which were determined by a systematic review of the literature. A2 + 1 immunization schedule was considered, and a 42% herd effect and 84.09% population coverage were assumed. The perspective was the Colombian health system with a time horizon of 5-years. The model showed greater protection of PCV13 in comparison to PCV10. A difference of 98 prevented deaths was observed for meningitis, pneu-

monia and sepsis. The opportunity cost difference found in the 5-year follow-up between PCV13 and PCV10 vaccines was COP (Colombian pesos) 36,128,082,380 at 2012 prices, which represents COP 7,225,616,476 of difference per year. PCV13 is considered the better alternative, this is mainly due to the impact that this vaccine has on the disease burden of the infections produced by *Streptococcus pneumoniae* in Colombian children under five years of age.

Key words: *Streptococcus pneumoniae*, pneumococcal vaccines, health economics, Colombia.

RESUMEN

Impacto económico de la vacunación con PCV13 frente al PCV10 en Colombia

Nuestro objetivo fue estimar la diferencia de los costos y los casos que se esperan de la cobertura de serotipos de la vacunas conjugadas 13-valente neumocócica (PCV13) y 10-valente neumocócica (PCV10), en la población menor de cinco años de edad en Colombia, mediante un modelo determinista. Se consideraron las probabilidades de incidencia, mortalidad y secuelas de las infecciones de neumonía, meningitis, sepsis y la otitis media aguda, así como la efectividad clínica de la PCV13 y la PCV10, que se determinaron mediante una revisión sistemática de la literatura. Se consideró un esquema de vacunación A2 + 1 y se supuso un efecto grupal del 42% y una cobertura de la población de 84,09%. La perspectiva fue el sistema de salud colombiano, con un horizonte temporal de cinco años. El modelo mostró una mayor protección de PCV13 en comparación con PCV10. Se observó una diferencia de 98 muertes que se evitaron por causa de la meningitis, la neumonía y la sepsis. La diferencia costo-oportunidad encontrada en el seguimiento de cinco años entre las vacunas PCV13 y la PCV10 fue de 36,128,082,380 pesos colombianos (COP) a precios de 2012, lo que representa una diferencia de COP 7,225,616,476 por año.

Palabras clave: *Streptococcus pneumoniae*, vacunas neumocócicas, economía de la salud, Colombia.

INTRODUCTION

Streptococcus pneumoniae (Sp) or pneumococcus is one of the most frequent causes of clinical conditions such as pneumonia, meningitis, bacteremia, sepsis and acute otitis

media (AOM) in children and adults. The pneumococcal disease is an important cause of morbidity, mortality and increased costs for the health system [1-4].

The World Health Organization (WHO) estimates that nearly 1.6 million persons, including 1,000,000 under-five children, die every year due to invasive pneumococcal disease (pneumonia, meningitis, sepsis) [3]. Thereby, every year are reported in the United States about 3,000 cases of meningitis, 50,000 cases of bacteremia, 500,000 cases of pneumonia and 7,000,000 of AOM [5, 6].

In developing countries the invasive pneumococcal disease is one determining factor of infant mortality. The case-fatality rate of pneumococcal pneumonia is 10-20%. In patients with invasive pneumococcal disease this rate may be as high as 40% [2].

A cost-effectiveness study conducted in Colombia, which was based on a hypothetical cohort of neonates born in 2009, showed that in absence of vaccination against pneumococcus there may be produced 701,326 to 812,796 cases of AOM, 14,670 to 24,020 cases of ambulatory and hospitalized radiological pneumonia and 380 to 633 cases of pneumococcal meningitis [7, 8].

The Ministry of Social Protection estimated that in Colombia from 8,000 to 10,000 cases per year of pneumococcal invasive disease and around 700 deaths of children less than 2 years of age occurred in 2006 [9].

As the pneumococcal disease is a public health priority in Colombia because it represents not only a high disease burden but also an economic impact on the care costs of above diseases and patient's productivity loss, the objective of this study was to estimate the difference of costs and expected cases from the serotype coverage of the 13-valent- and 10-valent pneumococcal conjugated vaccines (PCV13 and PCV10, respectively) in the population under five years in Colombia.

METHODS

A deterministic model with a fixed cohort of newborn children in Colombia was built. Information provided in 2011 by the National Department of Statistics (DANE) was used [10]. A 5-year simulation which included probabilities of incidence, mortality, pneumonia sequelae, meningitis, sepsis and AOM, as well as the clinical effectiveness of the conjugate vaccines PCV13 and PCV10 was performed.

The 2 + 1 vaccination schedule established in Colombia was used; in this schedule are administered doses at 2 and 4 months of age with a booster at 1-year of age. A 42% herd effect was assumed based on the Poehling *et al.* work [11] who studied the PCV7 effect

on the protection rate in the non-vaccinated population (children between 0 and 90 days of age) which were living with vaccinated children. The vaccination coverage used for the model was 84.09% in accordance with information reported by the Ministry of Health and Social Protection [12]. For the study vaccines the differences in protection were expressed as opportunity costs and net benefit.

Determination of the probabilities included in the model

The probabilities of incidence, mortality and sequelae of the study diseases in the population of children fewer than five years of age were estimated from a systemic review. The databases used for the search were: Medline, The Cochrane Library, BIREME, Science Direct and Google Scholar. Two independent investigators evaluated for inclusion the references obtained from the search, and the disagreements were resolved by consensus.

A search filter for population under five years of age was used, and for determining the mortality and incidence of diseases caused by *S. pneumoniae*, the MESH terms *Streptococcus pneumoniae*, *Pneumonia*, *Otitis media*, *Bacteremia*, *Meningitis*, *Incidence*, *Mortality*, *Disease burden and epidemiology* were used.

For an improved sensibility in the search of the sequelae of the diseases included, the following free text terms were used: Pneumococcus, Acute Otitis Media (AOM), Meningitis, Bacteremia, Pneumonia, sequelae and complications. In addition, in order to establish the sequelae mostly affecting patients with history of meningitis and AOM a consultation to experts was made. Sequelae from pneumonia and sepsis were not considered.

Determination of the conjugate vaccines effectiveness

A systematic search of randomized controlled clinical studies evaluating effectiveness of PCV10 and PCV13 was conducted. When clinical studies with the two vaccines were not available, studies comparing the vaccine with placebo were used. For cases where no information was found, the adjusted effectiveness of PCV10 and PCV13 was estimated, under the assumption that the effectiveness will increase proportionally with the number of covered serotypes, and the PCV7 clinical effectiveness was used as reference. The PCV13 and PCV10 effectiveness for prevention of sepsis and meningitis was calculated by multiplying the PCV7 effectiveness by the proportion of serotypes covered of each vaccine in the local isolations reported; this method already has been previously proposed [13-15].

The clinical effectiveness values of PCV7 for AOM, pneumonia, sepsis and meningitis were obtained. The information about effectiveness corresponded to the prevention of diseases above described, where the only causative agent was *S. pneumoniae*. The distribution of serotypes was taken from SIREVA II reports which are specific to isolations in the country for the years 2009-2011 in children under 59 months of age [16].

Costs of the health interventions

Direct costs of consumption of medical resources for interventions were determined in the study population using costs information provided by a Healthcare Promoting Entity (HCPE) providing healthcare services nationwide, which included direct medical costs for healthcare services and cases-type from the information taken of healthcare guides and consultation to clinical experts were created. The identifying of cost-generating events was carried out by a bottom up methodology. Once identified the different procedures and validated by consultation to clinical experts, the cost values were estimated in accordance with the ISS 2001 + 25% and 2013 SOAT tariffs manuals applicable in Colombia.

The perspective of the health system was applied in the costing process, which uses as parameters of quantification of cost-generating events, manuals recognized as economic parameters for recognition of services within contract models.

Indirect costs were related to the mortality and sequelae produced by the studied diseases. The mortality was estimated as years of potential life lost (YPLL), which was estimated according to the adapted YPLL ipc (investor-producer-consumer) model of Gardner and Sanborn [17]. This model weighs the deaths based on a balance between investment, production and potential consumption by each person in accordance with the productivity stage in which the person dies. This method divides the lifetime of a person into three periods: investment period (0 to 11 y), production period (12 to 62 y) and consumption period (62 y +), adjusted for Colombia under the Pension Amendment Act 797 of January 29, 2003 [18]. On the other hand, the sequelae were measured in life-years saved (LYS) which consist of the life-years lived with disability added to life-years lost because of premature mortality [19].

Time horizon

The health outcomes calculated for the 5-year period were discounted at a 3% annual rate, and the costs were not discounted given that they not were calculated for the future. Current (mean) values of 2012 were used, which then were multiplied with each one of the health outcomes (prevented disease cases, deaths and sequelae).

RESULTS

Data used in the model are summarized in Table 1. The cohort of children born in Colombia over the year 2011 was 652,616 children.

Table 1. Parameters of the deterministic model used for comparing the PCV10 and PCV13.

Parameters		Mean Value	Lower Limit	Upper Limit	Reference	
Population born in 2011		652,616			(7)	
Coverage (3 dose)		0.8409			(9)	
Discount rate		0.03				
YPLL	0 - 1 year	24.43				
	1 - 4 years	26.42				
	5 - 9 years	34.15				
Herd effect	PCV10	0.4			(8)	
	PCV13	0.4			(8)	
Meningitis	Incidence		0.000037	0.000008	0.000108	(23)
	Death		0.37	0.33	0.54	(22)
	Effectiveness	PCV10	0.624	0.523	0.723	(13, 17)
		PCV13	0.73	0.609	0.837	(13, 17)
	Sequelae	Mental retardation	0.045	0.041	0.062	(35)
		Hearing loss	0.099	0.081	0.123	(35)
		Paresis	0.048	0.041	0.052	(35)
		Other convulsion	0.037	0.031	0.052	(35)
		Eye injury	0.017	0.01	0.023	(35)
		Hydrocephaly	0.069			(36)
Pneumonia	Incidence		0.02012	NA	NA	(23)
	Death		0.05	0.05	0.06	(22)
	Effectiveness	PCV10	0.23	0.09	0.36	(20)
		PCV13	0.25	0.208	0.297	(13, 18)
	Sequelae	Empyema < 1 year	0.286	0.16	0.45	(37)

(It continues)

Table 1. Parameters of the deterministic model used for comparing the PCV10 and PCV13.
(Continued)

Parameters			Mean Value	Lower Limit	Upper Limit	Reference
Pneumonia	Sequelae	Empyema 2-4 years	0.141	0.076	0.246	(37)
AOM	Incidence		0.03117	NA	NA	(24)
	Effectiveness	PCV10	0.527	0.339	0.709	(24)
		PCV13	0.598	0.405	0.759	(24)
	Sequelae	Mastoiditis	0.0017	0.0002	0.006	
Sepsis	Incidence		0.000184	0.000094	0.000289	(23)
	Death		0.35	0.22	0.48	(22)
	Effectiveness	PCV10	0.619	0.56	0.67	(13, 17)
		PCV13	0.802	0.753	0.847	(13, 17)

NA: Not available.

To modeling the PCV10 and PCV13 effectiveness, taking as a basis the PCV7 results, was used the *Northern California Kaiser Permanent* (NCKP) study [20-22]. NCKP was a randomized double-blind clinical study conducted in 37,868 children under 15 months of age who were vaccinated with PCV7. The incidence of invasive pneumococcal disease, acute otitis media and pneumonia was evaluated. The reported effectiveness for invasive pneumococcal disease prevention by PCV7 for each serotype included in the vaccine was 97.4% (95% CI: 82.7%, 99.9%). For the pneumonia prevention effectiveness of PCV13, the PCV7 prevention effectiveness of 25.5% (95% CI: 6.5%, 40.7%) was used in accordance with Hansen *et al.* study [21].

A study evaluating the pneumonia prevention effectiveness of PCV10 in Latin American patients by Tregnaghi *et al.* was identified [23]; they estimated that the vaccine efficacy was 23% (95% CI: 9%, 36%) (Table 1).

For estimation of the prevention effectiveness of pneumococcal AOM per vaccine serotype by PCV13, the PCV7 effectiveness reported in Black *et al.* study [20] was used, which was 64.7% ($p = 0.035$), with an 83% distribution of the seven serotypes covered by the study. An adjustment was made in accordance with the distribution of vaccine serotypes in a Colombian population reported by Sierra *et al.* [24]. Finally, for the effectiveness of PCV10 for prevention of the pneumococcal AOM per vaccine serotypes was used as reference the 11-serotype conjugate vaccine presented in the Prymula *et al.* study [25], which was 52.6% (95% CI: 35.0%, 65.5%). The distribution of

serotypes covered by the vaccine in the study was 65.93%. The effectiveness adjustment was made in accordance with the distribution of serotypes reported by Sierra *et al.* [24].

Direct costs are reported in Table 2, with the method used for their calculation. The model results showed that PCV13 prevented 12 meningitis cases more than the PCV10. In addition, 1,187; 11,353 and 100 cases may be prevented of pneumonia, acute otitis media and sepsis, respectively (Table 3). The total number of deaths prevented was 98, which were mostly caused by pneumonia and sepsis, and corresponds to 2,714 YPLL.

Table 2. Direct costs of medical resources used in the study diseases caused by *Streptococcus pneumoniae* (COP).

Cost		Mean Value	Lower Limit	Upper Limit	Source	
2011 Colombia GDP per capita		12,787,200			Mundial Bank	
Schedule Cost	PCV13	85,536			HCPI	
	PCV10	76,680				
AOM						
2011	Inpatient care	1,478,532	392,889	12,014,498	HCPE	
	Outpatient care	156,626	24,347	1,115,282		
2012	Inpatient care	1,514,030	74,194	86,405,384		
	Outpatient care	150,274	14,529	52,881,079		
Case-type	Acute (85%)	109,386	63,961	154,810	Authors	
	Recurrent (15%)	890,296	662,306	1,118,285		
Pneumonia						
2011	Inpatient care	2,408,879	492,021	15,212,726	HCPE	
	Outpatient care	198,772	38,607	1,096,412		
2012	Inpatient care	2,238,235	243,698	67,705,484		
	Outpatient care	201,969	17,791	11,234,127		
Case-type	Mild (60%)	569,643	379,721	759,566	Authors	
	Critical (40%)	4,310,895	3,292,191	5,329,599		

(It continues)

Table 2. Direct costs of medical resources used in the study diseases caused by *Streptococcus pneumoniae* (COP). (Continued)

Cost		Mean Value	Lower Limit	Upper Limit	Source
Meningitis and sepsis					
2011	Inpatient care	1,672,864	681,978	3,334,248	HCPE
	Outpatient care	122,893	32,448	315,899	
2012	Inpatient care	7,446,978	378,096	46,579,991	
	Outpatient care	371,006	18,949	2,238,399	
	Case-type	10,792,183	8,473,122	13,111,244	Authors
Sequelae (Case-type)	Hearing loss	1,323,775	1,106,331	1,541,219	Authors
	Empyema	5,763,540	5,196,770	6,330,309	
	Mastoiditis	535,692	401,933	669,450	
Sequelae (HCPE 2011)	Hearing loss	1,067,249	24,959	14,070,451	HCPE
	Empyema	NA	NA	NA	
	Mastoiditis	62,231	55,461	66,721	
Sequelae (HCPE 2012)	Hearing loss	821,857	18,905	7,192,693	HCPE
	Empyema	NA	NA	NA	
	Mastoiditis	206,473	32,873	854,814	

NA: Not available.

No differences were found in the sequelae secondary to meningitis (Table 3). However, 68 and 100 empyema cases were prevented in infants under one year of age and in children 2-4 years old, respectively. Nineteen cases of mastoiditis sequelae were estimated to have been prevented by the PCV13.

The health outcomes not covered by the PCV10 use, expressed in Colombian currency (pesos) at 2012 prices (opportunity cost) ranged between a minimum of COP 36,748,072,015 and a maximum of COP 39,323,670,681, with an annual average between COP 7,349,614,403 and 7,864,734,136. The 82.9% represents the productivity loss associated with early deaths, 14.6% with morbidity cases and, in a lower percentage, sequelae owing to their low incidence (Table 4).

Table 3. Difference of number of cases, sequelae and deaths prevented by PCV10 and PCV13 (5-years horizon).

	PCV13	PCV10	Difference
Prevented cases			
Meningitis	80	68	12
Pneumonia	14846	13659	1187
AOM	55017	48484	6532
Sepsis	436	336	100
Prevented deaths			
Meningitis	29	25	4
Pneumonia	742	683	59
AOM	0	0	0
Sepsis	152	118	34
Total	924	826	98
YPLL			
Meningitis	813	695	118
Pneumonia	20464	18827	1637
AOM	0	0	0
Sepsis	4203	3244	959
Total	25480	22766	2714
Prevented sequelae			
<i>Meningitis</i>			
Mental retardation	4	3	1
Hearing loss	8	7	1
Paresis	4	3	1
Other convulsions	3	2	1
Visual damage	1	1	0
Hydrocephaly	5	5	0
<i>Pneumonia</i>			
Empyema < 1 year	849	781	68
Empyema 2-4 years	1256	1156	100

(It continues)

Table 3. Difference of number of cases, sequelae and deaths prevented by PCV10 and PCV13 (5-years horizon). (*Continued*)

	PCV13	PCV10	Difference
AOM			
Mastoiditis	94	82	12

When the health outcomes were evaluated as the prevented cases and bearing in mind only the vaccines costs, if the modeled cohort were vaccinated with PCV13, a discounted net benefit ranging between COP 300,705,179,186 and COP 325,848,596,224 would be obtained; and if the same population were vaccinated with PCV10 the discounted net benefit would range between COP 263,957,107,171 and COP 286,524,925,543.

If the differences in the results are expressed as LYS, PCV13 could prevent 2,870 deaths in the study population in comparison to PCV10.

Table 4. Difference in costs (COP) from cases, deaths and sequelae prevented by the PCV13 and PCV10.

	HCPE-2011	HCPE-2012	Cases-type	
			Minimum	Maximum
<i>YPLL differential cost</i>	32,607,812,876	32,607,812,876	32,607,812,876	32,607,812,876
Prevented cases - differential cost	3,290,971,526	3,517,395,550	3,357,534,759	5,760,431,143
Prevented sequelae - differential cost	1,700,698	2,873,954	782,724,379	955,426,662
Total differential cost	35,900,485,100	36,128,082,380	36,748,072,015	39,323,670,681
Total differential cost/ year	7,180,097,020	7,225,616,476	7,349,614,403	7,864,734,136

Opportunity cost for a 5-year time horizon.

DISCUSSION

This study shows the opportunity costs achieved with the PCV13 in children under 5 years of age in comparison to the PCV10, which generates savings for the Colombian health system if the PCV13 were used.

Basically, the opportunity cost was determined in this occasion by the number of prevented deaths. The lower number of deaths resulting from pneumococcus disease in the 2011 cohort of children vaccinated with PCV13 contributed to achieve greater opportunity costs. According to the results, a greater death proportion by sepsis and pneumonia could be prevented.

From the epidemiologic standpoint, the evidence available on the disease burden by *Streptococcus pneumoniae* in Colombia is very low, owing to the lower number of studies in the country. Valenzuela *et al.* [26] demonstrated that no studies on this topic had been conducted in Colombian before 2006.

According to the literature review conducted, the only study assessing the *Streptococcus pneumoniae* behavior in Colombian children under five years of age was performed by Benavides *et al.* [27] who studied the frequency of the invasive pneumococcal disease and pneumonia. However, it should be borne in mind the risk of a biased selection if considered that the study was exclusively performed on contributive health system population.

Taking the data published by Benavides *et al.* [27] and the Valenzuela *et al.* [26] results, it is possible to compare the frequency of the different diseases in Colombia and Latin America, respectively. The meningitis incidence in the country was lower than in the rest of Latin America, the meningitis incidence in children under 5 years of age reported by Valenzuela was 11 per 100,000-years.

For pneumonia, the behavior is similar between the national incidence and that of Latin America which was 2.834 cases per 100,000-years. On the other hand, the sepsis incidence used in the present document reported in the Benavides *et al.* study [27] was greater than that reported by Valenzuela *et al.* [26] of 12 cases per 100,000-years.

It is important to highlight that for OMA the effectiveness against serotypes included in the vaccine is considered based on the indications approved both to PCV10 and PCV13.

For children under five years in Colombia are available results from the Sierra *et al.* study [24] on the etiological distribution of children diagnosed with AOM. The results from this study showed that *Streptococcus pneumoniae* causes the 30% otitis

media cases. Above data are consistent with the information furnished by Bardach *et al.* [28] who found a 32.4% (95% CI: 27.1%, 38.0%) incidence of otitis media for Latin America and Caribe.

In this study the SIREVA II program results [16] were used to determine the proportion of cases ascribable to each serotype, in accordance with the *Streptococcus pneumoniae* isolations in the invasive pneumococcal disease cases between 2009 and 2011. Seventy per cent (70%) of the isolations corresponded to the serotypes 14, 1, 6b, 19a, 3, 18c and 23f.

In the calculation of PCV10 effectiveness the protective effect of the protein D against non-typeable *H. influenza* was not considered by us. Studies have shown that the effectiveness against non-typeable *H. influenzae* of this vaccine is controversial as evidenced by COMPAS [29] and Van den Bergh *et al.* [30] studies, in which no significant differences of prevention of otitis media and nasopharyngeal colonization were found from the clinical viewpoint.

Furthermore, the PCV10 cross protection to the serotype 19a was not considered, due to the protection against the 19f group. On the other hand, the PCV10 shows no cross protection against 19a and 6a, according to the COMPAS study [29]. There is evidence that the PCV7 vaccine which also protects against the serotype 19f shows no protection against serotype 19a as proven in a study conducted in Canada where its effectiveness was lower than 42% (95% CI: -76 -79%) [31]. In another study conducted in the United States, an increase of the serotype 19a was observed from the inclusion of PCV7 in the immunization program, a condition which evidences absence of protection against this serotype [32].

The PCV13 effectiveness against serotype 3 has been under discussion. Studies, such as that of Miller *et al.* in 2011 [33] have proven this ineffectiveness. However, this study involves the problem of having very small sample size that lead, therefore, to somewhat inaccurate results. This is also discussed by the Joint Committee on Vaccination and Immunization which concluded that few were the invasive disease cases produced by the serotype 3 in the place where the study was performed [34]. However, in the United States, the results of a study performed in 8 pediatric care centers showed that after implemented the use of PCV13, a 68% reduction of serotype 3 was observed in a 1-year period [35].

Owing to resources shortage, trade-offs are often necessary in medical decision taking. Gafni and Birch [36] make emphasis on the threshold value in the cost-effectiveness studies for decision making. However, decision makers need information on opportunity costs of a political decision (i.e., the next-best alternative which should be aban-

done as a result of the decision) for an efficiently improved allocation of resources [36]. Opportunity costs are health outcomes which might be achieved with other interventions not performed if these resources were compromised to the chosen intervention [37]. In the international context there are very few studies using the concept of opportunity cost to evaluate the impact of the use of vaccines and there are not publications related to pneumococcal vaccine.

An important advantage of our study is that an attempt was made of working with data originated in the country. Data recently published by Benavides were not available when Alvis and De la Hoz [38] and Castañeda *et al.* [15] performed their economic studies. In these studies data from Latin American countries were used as reference. In the same way the herd effect and sequelae effect expressed as LYS, have been taken into account.

The costs of the different interventions were obtained from local information supplied by a Health Promotion Entity (HCPE), which provide information under actual conditions within the market.

In addition, the costs estimated from the provided information (HCPE) and the information obtained from the construction of cases-type, corroborates that the costs reported by HCPE are within the ranges estimated for costs based on the intervals proposed within the cases-type.

It should be borne in mind that since HCPE information is based on contract models established with the different Health Care Providing Institutions (HCPs), the cost differences with the cases-type are determined by this type of characteristics in the Colombian health system.

Among the limitations of this study was the unavailability of studies conducted in Colombia allowing to elucidate the actual epidemiological situation generated by *Streptococcus pneumonia* in the study population, the unavailability of disease cost studies, the assumed adjustment of the effectiveness of the vaccines evaluated due to deficiency of the randomized clinical studies, and the unavailability of accurate diagnosis of patients with *Streptococcus pneumoniae* in the cases of AOM and pneumonia because the patients' diagnosis is usually based on radiological and clinical criteria which often lead to problems in the actual estimation of the disease caused by an infectious agent.

CONCLUSIONS

It was found that with the alternative PCV13 there would be less AOM, sepsis and pneumonia cases owing to additional coverage by this vaccine of the serotypes 3, 6a

and 19a which correspond to 17.32% of the *Streptococcus pneumonia* distribution in children under 5 years of age between 2009 and 2011. For meningitis these three serotypes constitute 10.94% and for sepsis and pneumonia 18.71% of the total serotypes isolated in Colombia.

If the vaccination is performed with the PCV13 alternative, the deaths in the 2011 children cohort associated with pneumococcal disease would be lower.

The health outcomes not covered by the use of vaccine PCV10, expressed in Colombian currency (pesos) at the 2012 prices (opportunity cost), range between a minimum and maximum amount of COP 36,748,072,015 and COP 39,323,670,681, respectively, with an annual mean between 7,349,614,403 and 7,864,734,136, where 82.9% of this value represents the productivity loss associate with early deaths, 14.6% the morbidity cases and in a lower percentage by the sequelae due to their low incidence.

When all the health outcomes are evaluated as prevented cases and take into account only the vaccines costs, the immunization with PCV13 of the modeled cohort would be obtained a discounted net benefit ranging between COP 300,705,179,186 and COP 325,848,596,224, and if the same population were vaccinated with PCV10, the net benefit would range between COP 263,957,107,171 and COP 286,524,925,543.

COMPETING INTERESTS

The economic evaluation was funded by Laboratorios Pfizer S.A.S.

REFERENCES

1. World Health Organization, Report of a meeting on priorities for pneumococcal and Haemophilus influenzae type b (Hib) vaccine development and introduction, URL: http://whqlibdoc.who.int/hq/2001/WHO_V&B_01.14.pdf, February 2013.
2. World Health Organization, Pneumococcal vaccines, *Wkly Epidemiol. Rec.*, **78**, 110 (2003).
3. World Health Organization, Pneumococcal conjugate vaccine for childhood immunization -WHO position paper, *Wkly Epidemiol. Rec.*, **82**, 93 (2007).
4. K. Edmond, A. Clark, V.S. Korczak, C. Sanderson, U.K. Griffiths, I. Rudan, Global and regional risk of disabling sequelae from bacterial meningitis: a systematic review and meta-analysis, *Lancet Infect. Dis.*, **10**, 317 (2010).

5. J. Casado, J. Aristegui, C.R. de Liria, J.M. Martinon, C. Fernández, Clinical data and factors associated with poor outcome in pneumococcal meningitis, *Eur. J. Pediatr.*, **165**, 258 (2006).
6. CDC, Recommendations of the Immunization Practices Advisory Committee (ACIP). Update Pneumococcal polysaccharide vaccine usage -United States. *Morb. Mortal. Wkly. Rep.*, **33**, 273 (1984).
7. P. Brotons, G. Gelabert, C. Launes, E. Sicuri, R. Pallares, C. Munoz, Cost of hospitalizing children with invasive pneumococcal pneumonia, *Vaccine*, **4**, 1117 (2013).
8. C. Castañeda, N. Alvis, A.J. Paternina, F. de la Hoz-Restrepo, Cost-effectiveness of the introduction of the pneumococcal polysaccharide vaccine in elderly Colombian population, *Vaccine*, **29**, 7644 (2011).
9. C. Castañeda, N. Alvis, F. de la Hoz. The impact of pneumococcal disease on adults living in Bogotá, Colombia, *Rev. Salud Pública*, **12**, 38 (2010).
10. Nacimientos 2011, Departamento Administrativo Nacional de Estadística (DANE), URL: http://www.dane.gov.co/index.php?option=com_content&view=article&id=1295&Itemid=119, February 2013.
11. K.A. Poehling, T.R. Talbot, M.R. Griffin, A.S. Craig, C.G. Whitney, E. Zell, C.A. Lexau, A.R. Thomas, L.H. Harrison, A.L. Reingold, J.L. Hadler, M.M. Farley, B.J. Anderson, W. Schaffner, Invasive pneumococcal disease among infants before and after introduction of pneumococcal conjugate vaccine, *JAMA*, **259**, 1668 (2006).
12. Ministerio de Salud y Protección Social, Sistema Integral de Información de la Protección Social, URL: <http://www.sispro.gov.co/Pages/Contruya%20Su%20Consulta/Vacunacion.aspx>, February 2013.
13. M.H. Rozenbaum, E.A. Sanders, A.J. van Hoek, A.G. Jansen, A. van der Ende, G. van den Dobbelsteen, G.D. Rodenburg, E. Hak, M.J. Postma, Cost effectiveness of pneumococcal vaccination among Dutch infants: Economic analysis of the seven valent pneumococcal conjugated vaccine and forecast for the 10 valent and 13 valent vaccines, *BMJ*, **340**, c2509 (2010).
14. J. Díez, M. Ridao, M.V. Gutiérrez, J. Puig, J.A. Lluch, E. Pastor, Pharmacoeconomic assessment of implementing a universal PCV-13 vaccination programme in the Valencian public health system (Spain), *Vaccine*, **29**, 9640 (2011).

15. C. Castañeda, N. Alvis, M. Velandia, F. de la Hoz, Cost-effectiveness of pneumococcal conjugate vaccines of 7, 10, and 13 valences in Colombian children, *Vaccine*, **30**, 1936 (2012).
16. Organización Panamericana de la Salud, SIREVA II (Sistema de Redes de Vigilancia de los Agentes Responsables de Neumonías y Meningitis Bacterianas), Washington, USA: Organización Panamericana de la Salud, URL: http://new.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=category&layout=blog&id=3609&Itemid=3953&lang=fr, February 2013.
17. J.W. Gardner, J.S. Sanborn, Years of potential life lost (YPLL) -What does it measure?, *Epidemiology*, **1**, 322 (1990).
18. Ley 797 de 2003. Por la cual se reforman algunas disposiciones del sistema general de pensiones previsto en la Ley 100 de 1993 y se adoptan disposiciones sobre los regímenes pensionales exceptuados y especiales (2003), URL: <http://www.alcaldiabogota.gov.co/sisjur/normas/Norma1.jsp?i=7223>, February 2013.
19. C. Mathers, T. Vos, A. López, J. Salomón, M. Ezzati, National burden of disease studies: A practical guide. Edition 2.0. Global Program on Evidence for Health Policy. Geneva: World Health Organization, URL: <http://www.who.int/healthinfo/nationalburdenofdiseasemanual.pdf>, February 2013.
20. S. Black, H. Shinefield, B. Fireman, E. Lewis, P. Ray, J.R. Hansen, L. Elvin, K.M. Ensor, J. Hackell, G. Siber, F. Malinoski, D. Madore, I. Chang, R. Kohberger, W. Watson, R. Austrian, K. Edwards, Efficacy, safety and immunogenicity of heptavalent pneumococcal conjugate vaccine in children. Northern California Kaiser Permanente Vaccine Study Center Group, *Pediatr. Infect. Dis. J.*, **19**, 187 (2000).
21. J. Hansen, S. Black, H. Shinefield, T. Cherian, J. Benson, B. Fireman, E. Lewis, P. Ray, J. Lee, Effectiveness of heptavalent pneumococcal conjugate vaccine in children younger than 5 years of age for prevention of pneumonia: Updated analysis using World Health Organization standardized interpretation of chest radiographs, *Pediatr. Infect. Dis. J.*, **25**, 779 (2006).
22. S.B. Black, H.R. Shinefield, S. Ling, J. Hansen, B. Fireman, D. Spring, J. Noyes, E. Lewis, P. Ray, J. Lee, J. Hackell, Effectiveness of heptavalent pneumococcal conjugate vaccine in children younger than five years of age for prevention of pneumonia, *Pediatr. Infect. Dis. J.*, **21**, 810 (2002).
23. M.W. Tregnaghi, X. Sáez, P. López, H. Abate, E. Smith, Evaluating the efficacy of 10 valent pneumococcal non-typeable *Haemophilus Influenzae* protein-D con-

- jugate vaccine (PHID-CV) against community-acquired pneumonia in Latin America, Abstract 412, Congreso SLIPE, 2011.
24. A. Sierra, P. López, M.A. Zapata, B. Vanegas, M. Castrejon, R. Deantonio, W.P. Hausdorff, R.E. Colindres, Nontypeable *Haemophilus influenzae* and *Streptococcus pneumoniae* as primary causes of acute otitis media in Colombian children: A prospective study, *BMC Infect. Dis.*, **11**, 4 (2011).
 25. R. Prymula, P. Peeters, V. Chrobok, P. Kriz, E. Novakova, E. Kaliskova, I. Kohl, P. Lommel, J. Poolman, J.P. Prieels, L. Schuerman, Pneumococcal capsular polysaccharides conjugated to protein D for prevention of acute otitis media caused by both *Streptococcus pneumoniae* and non-typable *Haemophilus influenzae*: A randomised double-blind efficacy study, *Lancet*, **367**, 740 (2006).
 26. M.T. Valenzuela, R. O'Loughlin, F. de la Hoz, E. Gómez, D. Constenla, A. Sinha, J.E. Valencia, B. Flannery, C.A. de Quadros, The burden of pneumococcal disease among Latin American and Caribbean children: Review of the evidence, *Rev. Panam. Salud Pública*, **270**, 25 (2009).
 27. J.A. Benavides, O.O. Ovalle, G.R. Salvador, S. Gray, D. Isaacman, G.L. Rodgers, Population-based surveillance for invasive pneumococcal disease and pneumonia in infants and young children in Bogotá, Colombia, *Vaccine*, **30**, 5886 (2012).
 28. A. Bardach, A. Ciapponi, S. García, D. Glujovsky, A. Mazzoni, A. Fayad, R.E. Colindres, A. Gentile, Epidemiology of acute otitis media in children of Latin America and the Caribbean: A systematic review and meta-analysis; *Int. J. Pediatr. Otorhinolaryngol.*, **75**, 1062 (2011).
 29. COMPAS: A phase III study to demonstrate efficacy of GlaxoSmithKline Biologicals' 10-valent pneumococcal vaccine (GSK1024850A) against Community Acquired Pneumonia and Acute Otitis Media GSK1024850A - Synflorix™ (10Pn): GlaxoSmithKline (GSK) Biologicals' 10-valent pneumococcal conjugate vaccine 2012, URL: <http://download.gsk-clinicalstudyregister.com/files/42228168-2da4-4fef-8442-299505cfe6ec>, February 2013.
 30. M.R. van den Bergh, J. Spijkerman, K.M. Swinnen, N.A. Francois, T.G. Pascal, D. Borys, L. Schuerman, E.P. Ijzerman, J.P. Bruin, A. van der Ende, R.H. Veenhoven, E.A. Sanders, Effects of the 10-valent pneumococcal nontypeable *Haemophilus influenzae* protein D-conjugate vaccine on nasopharyngeal bacterial colonization in young children: A randomized controlled trial, *Clin. Infect. Dis.*, **56**, 30 (2013).

31. G. Deceuninck, P. de Wals, N. Boulianne, G. de Serres, Effectiveness of pneumococcal conjugate vaccine using a 2 + 1 infant schedule in Quebec, *Canada Pediatr. Infect. Dis. J.*, **29**, 546 (2010).
32. M.R. Moore, R.E. Gertz, R.L. Woodbury, G.A. Barkocy-Gallagher, W. Schaffner, C. Lexau, K. Gershman, A. Reingold, M. Farley, L.H. Harrison, J.L. Hadler, N.M. Bennett, A.R. Thomas, L. McGee, T. Pilishvili, A.B. Brueggemann, C.G. Whitney, J.H. Jorgensen, B. Beall, Population snapshot of emergent *Streptococcus pneumoniae* serotype 19A in the United States, 2005, *J. Infect. Dis.*, **197**, 1016 (2008).
33. E. Miller, N.J. Andrews, P.A. Waight, M.P. Slack, R.C. George, Effectiveness of the new serotypes in the 13-valent pneumococcal conjugate vaccine, *Vaccine*, **29**, 9127 (2011).
34. Joint Committee on Vaccination and Immunization. Pneumococcal Subcommittee, URL: <http://media.dh.gov.uk/network/261/files/2012/07/JCVI-minutes-Pneumococcal-sub-committee-meeting-held-on-30-May-2012.pdf>, July 2013.
35. S.L. Kaplan, W.J. Barson, P.L. Lin, J.R. Romero, J.S. Bradley, T.Q. Tan, J.A. Hoffman, L.B. Givner, E.O. Mason, Early trends for invasive Pneumococcal infections in children after the introduction of the 13-valent Pneumococcal conjugate vaccine, *Pediatr. Infect. Dis. J.*, **32**, 203 (2013).
36. A. Gafni, S. Birch, Incremental cost-effectiveness ratios (ICERs): The silence of the lambda, *Soc. Sci. Med.*, **62**, 2091 (2006).
37. M.F. Drummond, B. O'Brien, G.L. Stoddart, G.W. Torrance, "Methods for the economic evaluation of health care programmes", Oxford University Press, New York, 1997.
38. N. Alvis, F. de la Hoz, Cost effectiveness of heptavalent pneumococcal conjugate vaccine in populations of high risk in Colombia, *Colomb. Med.*, **41**, 315 (2010).

REV. COLOMB. CIENC. QUÍM. FARM., VOL. 44, NÚMEROS 1 A 3, 2015

ÍNDICE GENERAL POR TIPO DE ARTÍCULOS

Artículos de investigación científica

- Descripción matemática del desempeño electroanalítico de nanopartículas de derivados de níquel en la determinación cualitativa y cuantitativa de metanol
Volodymyr V. Tkach, Reza Ojani, Jahanbakhsh Raoof, Ebrahim Zarei, Vasyly V. Nechyporuk, Petró I. Yagodynets', Silvio C. de Oliveira 5
- A descrição matemática do desempenho do sensor de dopamina, baseado no eletrodo da pasta de carbono, modificado por nanotubos e fragmentos da banana
Volodymyr V. Tkach, Reza Ojani, Vasyly V. Nechyporuk, Petró I. Yagodynets' 58
- Inhibitory effects of an extract of fruits of *Physalis peruviana* on some intestinal carbohydrases
Diana Patricia Rey, Luis Fernando Ospina, Diana Marcela Aragón 72
- Comparative calorimetry study of the phenol and acetaminophen adsorption on activated carbon in aqueous solution
Valentina Bernal, Liliana Giraldo, Juan Carlos Moreno-Piraján 90
- O comportamento de paracetamol durante a sua oxidação eletrocatalítica sobre poli(azul da anilina) e a sua descrição matemática
Volodymyr V. Tkach, Bahadurghatta Kumara Swamy, Reza Ojani, Olena Aksimentyeva, Jorge Zerbino, Petró I. 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
- 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. Galeano-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
Study of some properties of cyanopyridine derivatives in solutions Shipra Baluja, Jagdish Movalia	259
Estudio matemático de estabilidad de estado estacionario del desempeño del electrodo de la pasta de carbono, químicamente modificado por un líquido iónico, en la cuantificación del galato de propilo Volodymyr V. Tkach, Valdir Souza Ferreira, Reza Ojani, Michel O. Galeano-Espínola, Petró I. Yagodynets', Márcia H. de Rizzo da Matta	382
Artículos de investigación tecnológica	
Estabilidad del aceite de hígado de tiburón microencapsulado <i>vs. pool</i> de aceite Caridad García, Mirna Fernández, Mirta Castiñeira, Claudia Buendía, Brian Martínez, Orestes López, Antonio Nogueira	34
Optimización de la extracción alcohólica para la obtención de soluciones concentradas de propóleos Luis Enrique Rodríguez Rodríguez, Walter Góngora Amores, Ariel Escalona Arias, Mirtha Beatriz Miranda Bazán, Saidé Batista Suárez, Yordanka Bermúdez Cisnero	47
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 Loustanaú Cárdenas, Armando Felipe González González	139
Microencapsulación de aceite esencial de tomillo (<i>Thymus vulgaris</i>) en matrices poliméricas de almidón de ñame (<i>Dioscorea rotundata</i>) modificado Germán Eduardo Matiz Melo, Katerin Fuentes López, Glicerio León Méndez	189
Estabilidad de gotas nasales de efedrina Niurka Benítez, Juan Manuel Cordoví, Mirna Fernández, Reynerio Zamora, Nilia de la Paz, Pavel Cabrera	236

Análisis comparativo de la cinética de liberación de diclofenaco sódico a partir de matrices hidrofílicas en medios de disolución convencionales y biorrelevantes Plinio A. Sandoval, Ali Rajabi-Siahboomi, Luisa Fernanda Ponce D'León	282
--	-----

Determinación de hidroquinona usando un electrodo de carbono vítreo modificado con quitosano, nano tubos de carbono de pared múltiple y líquido iónico. Posible uso como sensor Laura Scarpetta, Adrián Mariño, Karen Bolaños, Yaritza Leiva, Paola Castiblanco, Édgar Nagles	311
--	-----

Novel gel-like microemulsion for topical delivery of Amphotericin B Claudia Salerno, Susana Gorzalczany, Alicia Arechavala, Silvia L. Scioscia, Adriana M. Carlucci, Carlos Bregni	359
---	-----

Artículos de investigación clínica

Fallo terapéutico de levotiroxina en el manejo de hipotiroidismo en una institución de salud de Bogotá, D. C. Un estudio analítico de prevalencia Julián Sánchez Castillo, José Julián López Gutiérrez	16
---	----

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
--	-----

Economic impact of vaccination with PCV13 vs. vaccination with PCV 10 in Colombia Jorge Díaz, José Urrego, Alexander Moreno, Juan Reyes, Fernando Peralta, Víctor Prieto, Paul Brown	397
---	-----

Artículos de revisión

Analgésicos en el paciente hospitalizado: Revisión de tema Álvaro Vallejos Narváez, Camilo Ruano, María Paula Ávila, Sergio Latorre, Jennifer Delgadillo, Gina Manosalva, Sindy Malaver, Esteban Hernández, Paula Torres, Guillermo Bernal, Andrea Tovar, Laura Caicedo	107
--	-----

Usos terapéuticos potenciales de los antagonistas opioides: Fisiopatología y evidencia preclínica Mauricio O. Nava-Mesa, Angélica Téllez-Arévalo, Daniel Rojas-Kozhakin, Carlos A. Calderón-Ospina	322
---	-----

Reporte de caso

Postural hypotension associated with inappropriate choice of drug treatment
of benign prostatic hyperplasia

Camilo Domínguez-Domínguez, Carlos Calderón-Ospina

276

Índice general de autores

Aksimentyeva, Olena	148	Guerrero-Perilla, Camilo	162
Aragón, Diana Marcela	72	Hernández, Esteban	107
Arechavala, Alicia	359	Latorre, Sergio	107
Ávila, María Paula	107	Leiva, Yaritza	311
Baluja, Shipra	259	León-Méndez, Glicerio	189
Batista-Suárez, Saidé	47, 139	López, Orestes	34
Benítez, Niurka	236	López-Gutiérrez, José Julián	16
Bermúdez-Cisnero, Yordanka	47	Loustanau-Cárdenas, Carlos	139
Bernal, Freddy A.	162	Malaver, Sindy	107
Bernal, Guillermo	107	Manosalva, Gina	107
Bernal, Valentina	90	Mariño, Adrián	311
Blanes, Montserrat	208	Martínez, Brian	34
Bolaños, Karen	311	Mascarenhas, Ronald	148
Bregni, Carlos	359	Matiz-Melo, Germán Eduardo	189
Brown, Paul	397	Miranda-Bazán, Mirtha Beatriz	47
Buendía, Claudia	34	Moreno, Alexander	397
Cabrera, Pavel	236	Moreno-Piraján, Juan Carlos	90
Caicedo, Laura	107	Movalia, Jagdish	259
Calderón-Ospina, Carlos A.	276, 322	Nagles, Edgar	311
Carlucci, Adriana M.	359	Nava-Mesa, Mauricio O.	322
Castiblanco, Paola	311	Naves, Plinio	179
Castiñeira, Mirta	34	Nechyporuk, Vasył V.	5, 58
Caviedes-Rubio, Diego Iván	220	Nogueira, Antonio	34
Cobos-Valdés, Dailín	139	Novais, Celice	179
Cordoví, Juan Manuel	236	Ojani, Reza	5, 58, 148, 208, 382
Coy-Barrera, Ericsson D.	162	Ospina, Luis Fernando	72
De la Paz, Nilia	236	Peralta, Fernando	397
De Oliveira, Sílvio C.	5	Ponce D'León, Luisa Fernanda	282
De Rizzo da Matta, Márcia H.	208, 382	Prieto, Víctor	397
Delgadillo, Jennifer	107	Rajabi-Siahboomi, Ali	282
Delgado, Daniel Ricardo	220	Raoof, Jahanbakhsh	5
Díaz, Jorge	397	Rey, Diana Patricia	72
Domínguez-Domínguez, Camilo	276	Reyes, Juan	397
Escalona-Arias, Ariel	47, 139	Rodrigues da Silva, Thatiane	179
Fernández, Mirna	34, 236	Rodríguez-Rodríguez, Luis Enrique	47, 139
Fuentes-López, Katerin	189	Rocha-Rodrigues, Maria Jéssica	179
Galeano-Espínola, Michel O.	208, 382	Rojas-Kozhakin, Daniel	322
García, Caridad	34	Ruano, Camilo	107
Giraldo, Liliana	90	Salerno, Claudia	359
Góngora-Amores, Walter	47, 139	Sánchez-Castillo, Julián	16
González-González, Armando Felipe	139	Sandoval, Plinio A.	282
Gorzalczany, Susana	359	Scarpetta, Laura	311

Scioscia, Silvia L.	359	Torres, Paula	107
Silva-Lima, Rosa	179	Tovar, Andrea	107
Sotomayor-Pino, Reinaldo Gabriel	220	Urrego, José	397
Souza-Ferreira, Valdir	382	Vallejos-Narváez, Álvaro	107
Swamy, Bahadurghatta Kumara	148	Yagodynets', Petró I.	5, 58, 148, 208, 382
Tajik, Somayeh	208	Zamora, Reynerio	236
Téllez-Arévalo, Angélica	322	Zarei, Ebrahim	5
Tkach, Volodymyr V.	5, 58, 148, 208, 382	Zerbino, Jorge	148

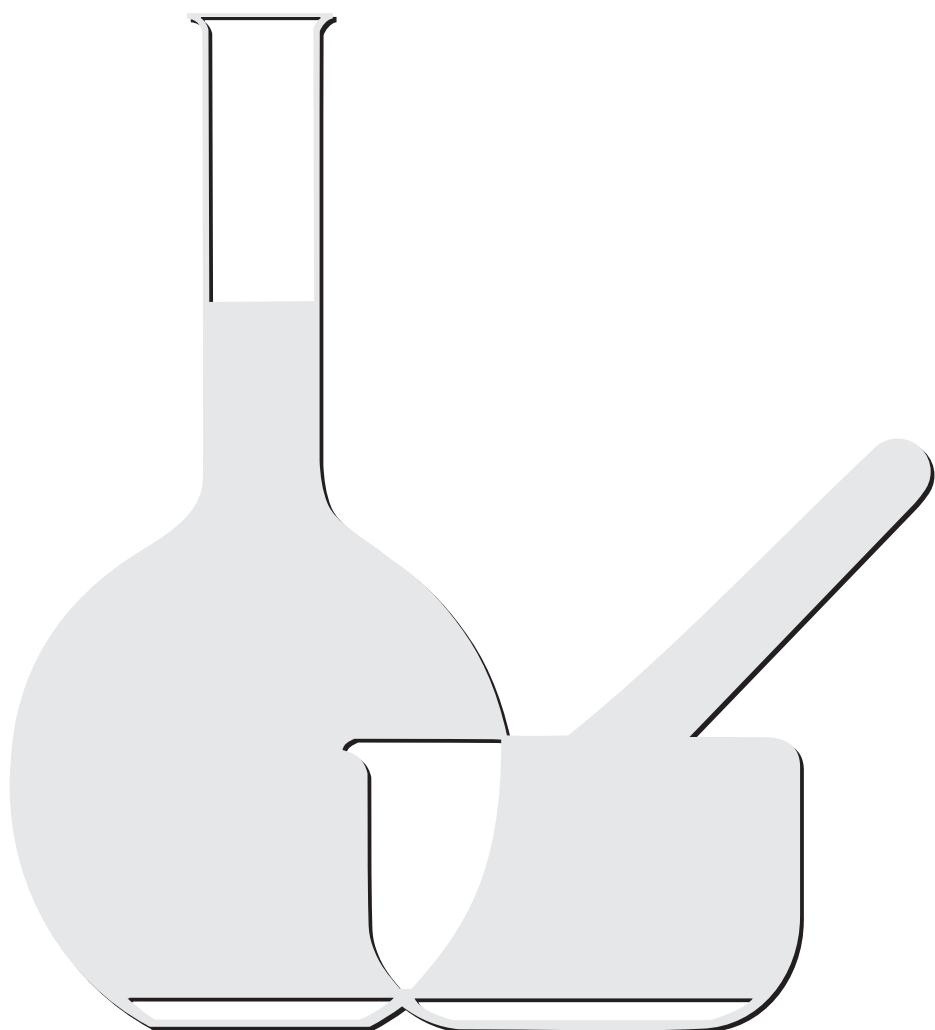
Índice analítico de términos

Español

Acetaminofén	107	Hiperplasia prostática	276
Aceite de hígado de tiburón	35	Hipotensión ortostática	276
Aceite microencapsulado	35	Hipotiroidismo	16
Acné	190	IKBI	220
Alfa amilasa	73	Índice de refracción	259
Alfa glucosidasa	73	Innovación tecnológica	140
Almidones modificados	190	Integrales inversas de Kirkwood-Buff	220
Analgesia	107	Leishmaniasis cutánea	359
Analgesia multimodal	107	Levotiroxina	16
Analgésicos	107	Lipofilización	190
Análisis de bifurcaciones	382	Líquido iónico	282, 382
Anfotericina B	359	Maltasa	73
Antagonistas adrenérgicos alfa	276	Medios biorrelevantes	282
Antagonistas opiáceos	322	Metamizol	107
Antiinflamatorios no esteroideos	107	Metanol	5
Antifúngicos	163	Methocel	282
Aplicación tópica	359	Método de purificación	48
Carbohidrasas intestinales	73	Microemulsión tipo gel	359
Carbón activado	91	Microencapsulación	190
Cinética	282	<i>N</i> -miristoil transferasa	163
Clorhidrato de efedrina	236	Nanopartículas de níquel	5
Colombia	397	Naringina	220
Conductancia	259	Opioides	107
Densidad	259	Optimización	48
Derivados de cianopiridina	259	<i>Physalis peruviana</i>	73
DDSA	190	Paciente hospitalizado	107
Diclofenaco	282	Parámetros de calidad	140
<i>Docking</i> molecular	163	Polímeros conductores y compositos	5
Doxazosina	276	Polyox	282
Economía de la salud	397	Preservos antimicrobianos	236
Electrodo modificado	311	Proceso de elaboración	140
Electrodos de pasta de carbono	382	Productos naturales	163
Entalpía de inmersión	91	Propóleos	48, 140
Estado estacionario estable	5	Reacción adversa	107
Estabilidad	35, 236	Sensores electroquímicos	5, 382
Factores de riesgo	16	Sistema opioide	322
Fallo terapéutico	16	Sólidos totales	140
Gotas nasales	236	Solubilidad	220
Hidrólisis	190	Solución acuosa de fenol	91
Hidroquinona	311	Solución acuosa de acetaminofén	91
		Solución concentrada	48, 140
		Solvatación preferencial	220

<i>Streptococcus pneumoniae</i>	397	Elderly	180
Tamsulosina	276	Electrochemical sensors	6, 59, 209, 382
Teoría de estabilidad lineal	382	Electropolymerization	149
Termogramas	91	Enthalpy of immersion	90
<i>Thymus vulgaris</i>	190	Ephedrine hydrochloride	237
Trastornos del sistema opioide	322	Gel-like microemulsion	359
Vacunas neumocócicas	397	Health economics	397
Vitamina A	35	Hospitalized patient	108
Voltamperometría de adsorción	311	Hydrazine	209
		Hydrolysis	190
		Hydroquinone	311
		Hypothyroidism	17
Inglés		IKBI	221
Acetaminophen	108	Intestinal carbohydrases	73
Acne	190	Inverse Kirkwood-Buff integrals	221
Activated carbon	90	Ionic liquid	311, 382
Adrenergic alpha-1 receptor antagonists		Kinetics	282
Adsorption voltammetry	311	Levothyroxine	17
Adverse reaction	108	Linear stability theory	209, 382
Alpha glucosidase	73	Lipophilization	190
Alpha amylase	73	Maltase	73
Amphotericin B	359	Mathematical modeling	59
Analgesia	108	Medicines	180
Analgesics	108	Metamizol	108
Antifungal	162	Methanol	6
Aqueous solution of acetaminophen	90	Methocel	282
Aqueous solution of phenol	90	Microencapsulated oil	35
Banana	59	Microencapsulation	190
Bifurcation analysis	382	Modified electrode	311
Biorelevant media	282	Modified starches	190
2,7-Bis-(ferrocenyl)-ethynyl)-fluoren-9-one	209	Molecular docking	162
Carbon-based materials	59	Multimodal analgesia	108
Carbon paste electrode	382	<i>N</i> -myristoyl transferase	162
Colombia	397	Naringin	221
Concentrated solution	48, 140	Nasal drops	237
Conductance	259	Natural products	162
Conducting polymers and composites	6	Nickel-containing nanoparticles	6
Cutaneous leishmaniasis	359	Non-steroidal anti-inflammatory drugs	108, 180
Cyanopyridine derivative	259	Opiate antagonist	322
DDSA	190	Opioid system	322
Density	259	Opioid-related disorders	322
Diclofenac	282	Opioids	108
Diclofenac potassium	180	Optimization	48
Dopamine	59	Orthostatic hypotension	276
Doxazosin	276		

Oscillations	149, 209	<i>Thymus vulgaris</i>	190
Paracetamol	149	Topical delivery	359
<i>Physalis peruviana</i>	73	Total solids	140
Pneumococcal vaccines	397	Vitamin A	35
Poly(aniline blue)	149		
Polyox	282	Portugués	
Preferential solvation	221	Anti-inflamatórios não esteroidais	180
Preservative agents	237	Automedicação	180
Process development	140	Banana	58
Propolis	48, 140	2,7-bis(ferrocenil-etinil)-fluoreno-9-ona	208
Prostatic hyperplasia	276	Diclofenaco de potássio	180
Purification method	48	Dopamina	58
Quality parameters	140	Electropolimerização	148
Refractive index	259	Estado estacionário estável	148
Risk factors	17	Hidrazina	208
Self-medication	180	Idosos	180
Shark liver oil pool	35	Materiais na base de carbón	58
Solubility	221	Medicamentos	180
Stability	35, 237	Modelagem matemática	58
Stable steady-state	6, 149	Oscilações	148, 208
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	397	Paracetamol	148
Tamsulosin	276	Poli(anilina azul)	148
Technological innovation	140	Sensores electroquímicos	58, 208
Therapeutic failure	17	Teoria de estabilidade linear	208
Thermogram	90		



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 arábica 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 arábica 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 λ max (solvente ϵ) nm (log ϵ). Ej.: UV λ max (MeOH) 275 (log ϵ 2.94).

IE ν max (medio) cm^{-1} . Ej.: ir ν max (KBr) 1740, 1720 cm^{-1} .

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

RMN ^1H (solvente, frecuencia de registro) δ ppm (integración, multiplicidad, J en Hz, asignación). Ej.: RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) 3.84 (1H, *d*, J = 10.3 Hz, H-30).

RMN ^{13}C (solvente, frecuencia de registro) δ ppm (multiplicidad, asignación). Ej.: RMN ^{13}C (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, CHCl_3 = cloroformo, C_6H_6 = benceno, AcOEt = acetato de etilo, EP = éter de petróleo, Me_2CO = 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, título 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, The chemistry and biochemistry of simple indolizidine and related polyhydroxy alkaloids. 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

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

*Revista Colombiana
de Ciencias Químico-Farmacéuticas, 44(3)*
se terminó de imprimir y encuadernar
en Proceditor, sobre papel bond de 90 gramos
Bogotá, D. C., Colombia.