

Facultad de Ciencias
Sede Bogotá



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

REVISTA COLOMBIANA DE CIENCIAS QUÍMICO-FARMACÉUTICAS

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias
Departamento de Farmacia



Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm., Vol. 45(1), abril 2016

REVISTA COLOMBIANA DE CIENCIAS QUÍMICO-FARMACÉUTICAS

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

ISSN 0034-7418, Fax: 3165060, Cra. 30 No. 45-03, Bogotá, D. C., Colombia.

Correo electrónico: rciquifa_fibog@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.

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

Comité Editorial:

Abolghasem Jonyban, 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.

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

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

Evaluadores:

Daniel M. Jiménez, M. Sc. (C), Departamento de Farmacia, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, D. C., Colombia.

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

Diana M. Cristancho, M. Sc., Laboratorio Farmacéutico GenFar-Sanofi, Bogotá D.C., Colombia.

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

Jesús Molpeceres, Ph. D., Departamento de Ciencias Biomédicas, Facultad de Farmacia, Universidad de Alcalá, Alcalá de Henares, Madrid, España.

Jorge A. Díaz, M. Sc., Ph. D. (C), Departamento de Farmacia, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, D. C., Colombia.

Maria R. Aberturas, Ph. D., Departamento de Ciencias Biomédicas, Facultad de Farmacia, Universidad de Alcalá, Alcalá de Henares, Madrid, España.

Reinaldo G. Sotomayor, M. Sc., Área de Tecnología Farmacéutica, Facultad de Química y Farmacia, Universidad del Atlántico, Barranquilla, Colombia.

Santiago Torrado, Ph. D., Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid, España.

Zaira J. Cárdenas, M. Sc. (C), Departamento de Farmacia, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, D. C., Colombia.

Edición, armada electrónica e impresión: Proceditor Ltda., Bogotá. Teléfonos: 757 9200. Fax: ext. 102. Correo electrónico: proceditor@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

Estudio de la estabilidad de emulsiones con estructuras líquido-cristalinas, y su aplicación farmacéutica mediante el agregado de un principio activo liposoluble: Econazol Gastón Lillini, Ricardo Pasquali, Cristian Pedemonte, Carlos Bregni, Susana Lavaselli	5
Modelagem matemática do desempenho de sensores fotoeletroquímicos, baseados no elétrodo Ti/TiO ₂ Volodymyr V. Tkach, Reza Ojani, Ebrahim Zarei, Olena I. Aksimentyeva, Vasył' V. Nechyporuk, Petró I. Yagodynets'	21
Estudio de utilización de antibióticos en el servicio de consulta externa de un hospital público en Bogotá, D.C. José Julián López, Adriana Marcela Garay	35
Diseño de un sistema bioadhesivo de clorhexidina empleando pullulan como matriz para uso en mucosa oral Jean M. Castro Ruiz, Bibiana M. Vallejo Díaz, Helber J. Barbosa Barbosa	48
Estudo matemático de estabilidade do desempenho do sistema [Fe(CN) ₆] ³⁻ /[Fe(CN) ₆] ⁴⁻ como mediador na eletrorredução de nitrito, com fins eletroanalíticos Volodymyr V. Tkach, André Santos, Reza Ojani, Petró I. Yagodynets'	77
Principales hábitos de medicación por los propietarios de caninos que acuden a consulta veterinaria en Pasto, Nariño, Colombia Juan M. Astaiza Martínez, Carmenza J. Benavides Melo, Grace K. Muñoz García, Melissa F. Mora Muñoz, Carlos A. Cháves Velasquez	92
Validación de una metodología analítica para la cuantificación de polifenoles totales, en procesos de extracción asistida por microondas sobre frutos de la especie colombiana <i>Vaccinium meridionale</i> Wilfred E. Espinosa Manrique, Luis C. A. Garzón Salcedo, Oscar J. Medina Vargas	109
Adaptación y optimización de un método de lectura por fluorometría en el modelo farmacológico <i>in vitro</i> de cultivo de <i>Plasmodium falciparum</i> María Helena Arias Marciales, Yinneth Victoria Rodríguez Novoa, Giovanni Garavito Cárdenas.	127
Nanopartículas lipídicas a base de propóleos como transportadores de activos de interés cosmético: Desarrollo, caracterización y evaluación de seguridad Yuly X. Correa González, Daniela Paillí Jiménez, Alba L. Valenzuela Correa, Maritza A. Rojas Cardozo, Claudia E. Mora Huertas	147

Estudio de la estabilidad de emulsiones con estructuras líquido-cristalinas, y su aplicación farmacéutica mediante el agregado de un principio activo liposoluble: Econazol

Gastón Lillini¹, Ricardo Pasquali^{2†}, Cristian Pedemonte¹, Carlos Bregni², Susana Lavaselli^{1*}

¹ Área Técnica Farmacéutica, Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, Universidad Nacional de Rosario. Suipacha 531 (2000). Rosario, Argentina.

* Correo electrónico: slavasel@bioyf.unr.edu.ar

² Cátedra Tecnología Farmacéutica, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires. Junín 956 (1113). Buenos Aires, Argentina.

Recibido para evaluación: 11 de agosto de 2015.

Aceptado para publicación: 19 de enero de 2016.

RESUMEN

La piel es un órgano apropiado para administrar principios activos con el fin de obtener efectos locales o sistémicos. Las formulaciones de uso tópico más comunes son: lociones, emulsiones, suspensiones, cremas, pomadas; las cuales deben reunir determinadas condiciones para ser aplicadas sobre la piel. El objetivo del presente trabajo es seleccionar una emulsión preparada con la técnica de formación de cristales líquidos compuesta de ácido esteárico, vaselina líquida, trietanolamina, propilparabeno, metilparabeno y agua, a la que se le incorpora un ingrediente farmacéutico activo liposoluble: *econazol*. El econazol, principio activo cuya vía de administración es la tópica y su acción es local, es una sustancia soluble en aceites, que se aloja en la fracción liposoluble de los cristales líquidos y en la fase interna de la emulsión sin que se modifique el perfil reológico ni la estabilidad de los sistemas. Se estudió además del HLB y de sus comportamientos reológicos, la presencia de cristales líquidos con luz polarizada, la existencia de gotas secundarias con luz común y la estabilidad de los sistemas por centrifugación y estrés térmico a temperaturas de 40 °C. Los valores obtenidos en los estudios realizados, demostraron que la emulsión lograda presenta un perfil reológico y las condiciones de estabilidad adecuadas para ser utilizada como crema medicinal.

Palabras clave: Cristales líquidos liotrópicos, emulsiones, HLB, gotas secundarias, reología, Econazol.

SUMMARY

Study of emulsions stability with liquid crystals structure and their pharmaceutical application by the addition of a liposoluble principle active: Econazole

The skin is the appropriate organ to administrate active principles in order to obtain local or systemic effects. Formulations for topical use most common are: lotions, emulsions, suspensions, creams, ointments, which must gather certain conditions to be applied to the skin. In this work, the objective is to select an emulsion prepared by a technique of liquid crystals formation composed by stearic acid, mineral oil, triethanolamine, propylparaben, methylparaben and water. To this formula we incorporated a pharmaceutical active liposoluble ingredient: econazole. Econazole, a principle active with topical administration and local action, is a substance soluble in oils, which stays in the liposoluble fraction of the liquid crystals and in their internal phase of the emulsion without modifying their rheological profile not even the stability of systems. Besides the HLB of the systems and their rheological behaviour we also study the presence of liquid crystals with polarized light, the existence of secondary drops with common light and systems stability by centrifugation, thermal stress and temperatures of 40 °C. The values obtained from the studies made, demonstrated that the emulsion achieved present a rheological profile and stability conditions suitable for medicinal use cream.

Key words: Lyotropic liquid crystals, Emulsions, HLB, Secondary droplets, Rheology, Econazole.

INTRODUCCIÓN

La piel es un órgano apropiado para aplicarle medicamentos, siendo considerada una vía para administrar principios activos con el fin de obtener efectos locales o sistémicos. Las formulaciones de uso tópico más comunes son: lociones, emulsiones, suspensiones, cremas, pomadas, las cuales deben reunir determinadas condiciones para que sean adecuadas para ese fin. Se deberá considerar: la estabilidad física del sistema, la estabilidad química del principio activo en ese medio, el pH, la viscosidad, la velocidad de difusión del principio activo, las características organolépticas, entre otros aspectos.

En este trabajo estudiamos emulsiones conteniendo un principio activo de acción local; así, se empleó econazol principio activo cuya vía de administración es la tópica. Esta es

una sustancia muy poco soluble en agua pero soluble en aceites. Su nombre químico en inglés es: 1-[2-[(4-chlorophenyl)methoxy]-2-(2,4-dichlorophenyl)ethyl]-1H-imidazole y su peso molecular es 381,68 g/mol. El econazol es un derivado imidazólico, que aplicado tópicamente desarrolla un potente efecto fungicida sin acción sistémica.

El econazol es un principio activo muy utilizado en la industria farmacéutica para la preparación de productos de uso dermatológico, indicados en micosis dermoepidérmicas, onicomycosis y candidiasis vaginal. Las formas farmacéuticas comercialmente conocidas son cremas, lociones, spray, polvos y óvulos; la concentración de uso es del 1% excepto en los óvulos de 150 mg/unidad.

Es posible obtener emulsiones de tipo aceite en agua termodinámicamente más estables al adecuar diversos factores como la técnica utilizada para formar la emulsión, la velocidad y tiempo de agitación, las proporciones de fases aceite/agua, el (los) emulgente(s), el (los) estabilizante(s), etc., para favorecer la estabilidad.

Existen múltiples métodos para la obtención de emulsiones; actualmente, varias técnicas específicas han sido ampliamente estudiadas para obtener emulsiones con cristales líquidos liotrópicos [1]. La formación de una interfase con características líquido-cristalinas (ver figura 1) [2] favorece la estabilidad de una emulsión, porque impide la coalescencia de los glóbulos de la fase interna. En este tipo de emulsiones se adsorben las moléculas del emulsionante (incluidas las de alcoholes de cadena larga y ácidos grasos, entre otras sustancias anfifílicas) en la interfase aceite-agua formando una multicapa [3, 4]. Esta multicapa que rodea a las gotas de la emulsión reduce las interacciones de van der Waals entre las gotas de aceite y actúa como una barrera contra la coalescencia [5]. Susuki, Takei y Yamazaki atribuyen la estabilidad de las emulsiones con cristales líquidos al incremento de la resistencia mecánica de la interfase aceite-agua y a la fijación de las gotas de la emulsión en la estructura líquida-cristalina [6], evitando modificaciones en su comportamiento reológico [7].

De acuerdo con Suzuki, se pueden obtener emulsiones formadas por gotas muy pequeñas (y, por lo tanto, muy estables) agregando la fase oleosa sobre una fase líquida-cristalina que contiene parte de la fase acuosa, incluyendo el emulsionante [6]. Después de formar una emulsión de aceite en cristal líquido se agrega el resto de la fase acuosa, lo que conduce a la formación de una emulsión del tipo aceite en agua finamente dividida.

En ciertas emulsiones, con características líquida cristalinas, se observa la formación de gotas secundarias, estas son agregados de gotas rodeadas por una estructura liotrópica laminar, formada por un tensioactivo, un alcohol de cadena larga (o un ácido graso) y agua. Entre otras particularidades, las emulsiones con gotas secundarias presentan una velocidad de evaporación del agua menor que las emulsiones ordinarias [8].

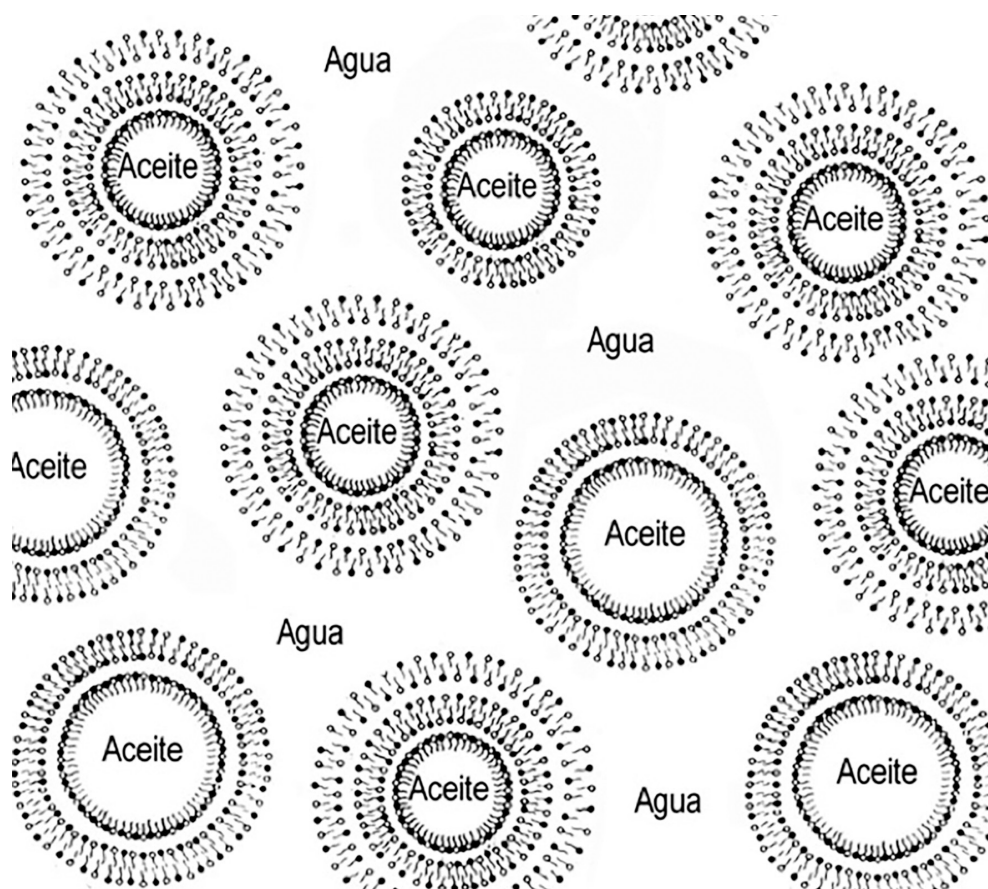


Figura 1. Esquema de una emulsión con interfase líquida-cristalina

Las emulsiones con cristales líquidos ofrecen muchas ventajas en el diseño de sistemas capaces de proteger fármacos de la oxidación o la hidrólisis, y, probablemente, de proporcionar velocidades controladas de liberación de activos. Todos los productos pueden ser caracterizados y sus propiedades serían reproducibles. El impacto del desarrollo del tipo de formulaciones descritas, a nivel de las ciencias farmacéuticas, radica en lograr una emulsión con cristales líquidos (agregándole econazol) que posea una reología adecuada y sea estable, para utilizarse como emulsión dermatológica.

Como objetivo general, en el presente trabajo se investigó la posibilidad de obtener emulsiones estables con estructuras líquido-cristalinas como vehículo para incorporar principios activos liposolubles, y asegurar que mediante esa incorporación las emulsiones no modifiquen su viscosidad ni la característica de poseer cristales líquidos. Se tomó como referente el principio activo econazol. Así, se plantearon los siguientes objetivos específicos:

1. Estudiar la estabilidad de seis sistemas emulsivos preparados por una misma técnica y con distintas concentraciones de ácido esteárico, de los cuales se va a elegir el sistema apropiado para la incorporación de principios activos. A estos sistemas se les realizaron los siguientes ensayos: a. Perfil reológico, b. Observación microscópica con luz común y polarizada, c. Medición del HLB y d. Estabilidad física.
2. Una vez elegido el sistema, se preparan emulsiones convencionales y emulsiones con interfases líquido-cristalinas con y sin el agregado de un principio activo (econazol) a saber: emulsión convencional (sistema patrón 1), emulsión convencional con econazol (muestra 1), emulsión con interfase líquido cristalina (sistema patrón 2) y emulsión con interfase líquido cristalina con econazol (muestra 2). Sobre esas emulsiones, se estudió: a. Comportamiento reológico y b. Observación microscópica con luz común y luz polarizada.

METODOLOGÍA

Materiales

Las sustancias empleadas: vaselina líquida, ácido esteárico, metilparabeno (Nipagin®), propilparabeno (Nipazol®) y econazol nitrato, correspondían con los requisitos establecidos en *Farmacopea Nacional Argentina* (7.^a edición). La trietanolamina empleada tenía la calidad para uso en dermatocosmética. Todas las sustancias fueron adquiridas en droguerías medicinales.

Objetivo específico 1. Elección de un sistema adecuado para la incorporación de un principio activo

Se trabajó con ácido esteárico en concentración creciente, donde la relación molar estearato de trietanolamina: ácido esteárico (masa molecular relativa media = 270) [9] estuvo comprendida entre 1:0 y 1:2,5. La composición de los seis sistemas emulsivos se detalla en la tabla 1.

Técnica de preparación

Se prepararon 100 g de cada uno de los seis sistemas con características líquido-cristalinas. Por un lado se funde la fase oleosa formada por ácido esteárico, vaselina líquida y propilparabeno en una cápsula de acero inoxidable a baño maría, a una temperatura que oscile entre 70 y 75 °C, y de otro lado, se prepara parte de la fase acuosa formada por trietanolamina, metilparabeno y parte del agua a la misma temperatura que la fase oleosa [9]. Se agrega la fase oleosa sobre parte de la fase acuosa agitando mecánicamente, con un agitador de cuatro paletas a una velocidad de 50 rpm. Una vez homogeneizado

el sistema, se diluye en el agua restante (a 70-75 °C) aumentando progresivamente la velocidad desde 50 rpm hasta 500 rpm. En todos los sistemas la agitación se mantuvo a 500 rpm durante 10 minutos con una temperatura final de, aproximadamente, 40 °C.

Tabla 1. Composición de los seis sistemas

	Sistema N.º 1	Sistema N.º 2	Sistema N.º 3	Sistema N.º 4	Sistema N.º 5	Sistema N.º 6
Vaselina	20,00 g	20,00 g	20,00 g	20,00 g	20,00 g	20,00 g
Ác. esteárico	8,00 g	11,94 g	15,00 g	20,00 g	23,32 g	28,00 g
Trietanolamina	4,14 g	4,14 g	4,14 g	4,14 g	4,14 g	4,14 g
Nipagin®	0,07 g	0,07 g	0,07 g	0,07 g	0,07 g	0,07 g
Nipasol®	0,03 g	0,03 g	0,03 g	0,03 g	0,03 g	0,03 g
Agua c. s. p.	100,00 g	100,00 g	100,00 g	100,00 g	100,00 g	100,00 g

Ensayos realizados

a. Perfil reológico

Las determinaciones se realizaron por triplicado a $25 \pm 0,5$ °C con un viscosímetro marca Brookfield, modelo DV II + Programable Viscometer, de cilindros coaxiales, se utilizó un rotor N.º 29, las lecturas se registraron cada 5 minutos a velocidades angulares crecientes y decrecientes (por escalones), que variaron entre 0,5 y 100 rpm, siempre que la emulsión y la sensibilidad del viscosímetro lo permitiesen [10].

b. Observación microscópica

Se empleó un microscopio polarizante marca Carl Zeiss modelo Axiolab provisto de cámara fotográfica digital Olympus SP 35. Para observar la presencia de cristales líquidos se depositó una película fina de cada sistema en el portaobjeto [11]. Para determinar la presencia de gotas secundarias se observó con luz ordinaria la dilución 1:10 de cada sistema [9].

c. Medición del HLB

Los agentes tensioactivos son moléculas que poseen una parte lipófila y otra hidrófila, la escala más utilizada para medir la relación entre la parte hidrófila y la lipófila de un tensioactivo es el HLB (*hydrophilic-lipophilic balance*) o equilibrio hidrófilo-lipófilo. La escala de HLB es una medida de la hidrofilia del tensioactivo; los valores más altos corresponden a tensioactivos más polares, y los más bajos a compuestos menos polares [12, 13].

Los aceites y ceras, que constituyen la fase oleosa de las emulsiones, tienen diferentes requerimientos de HLB para formar una emulsión O/A o A/O. Estos valores se conocen como HLB requerido (HLB_R) por la fase oleosa y sirven como criterio de selección del emulgente [12, 13]. La fase oleosa de una emulsión está constituida normalmente por varios componentes. El HLB_R de una mezcla de excipientes se calcula utilizando la siguiente ecuación [14]:

$$HLB_R (\text{fase oleosa}) = \sum X_A \cdot HLB_R^A$$

d. Estabilidad física

Para determinar la estabilidad física se aplicaron los siguientes métodos, en todos los casos se realizaron por triplicado:

- *Centrifugación*

Se utilizó una centrifuga Gelectronic G-42, se centrifugaron 5 g de cada emulsión durante 30 minutos a 2500 rpm.

- *Estrés térmico*

Se realizaron almacenamientos consecutivos durante 48 horas a cada una de las siguientes temperaturas: 40 ± 2 °C, 5 ± 2 °C y 40 ± 2 °C. Al finalizar el ensayo se observaron las muestras a simple vista con el fin de detectar separación de fases, y con microscopio polarizante para detectar posibles cambios en las características líquido-cristalinas.

- *Estabilidad física a 40 °C*

Los sistemas se almacenaron durante 1 mes a 40 ± 2 °C. Luego se observó visualmente para detectar separación de fases y con microscopio polarizante para detectar posibles cambios en las características líquido-cristalinas.

Objetivo específico 2. Preparación de emulsiones

A partir del sistema elegido en el objetivo 1 (sistema N. ° 3), se prepararon emulsiones convencionales y emulsiones con interfases líquido-cristalinas con y sin el agregado de un principio activo (econazol). La composición de los sistemas está detallada en la tabla 2.

El patrón 1 y la muestra 1 fueron preparadas por técnicas convencionales, es decir, se agregó la fase acuosa a la fase oleosa (ambas a una temperatura de 70 °C, aproximadamente) con agitación manual hasta la formación de las emulsiones. El patrón 2 y la muestra 2 fueron preparadas por técnica de formación de cristales líquidos, como se

describió para la preparación de los seis sistemas en el objetivo 1. A las muestras 1 y 2 se les incorporó *econazol nitrato* como principio activo, este se agregó a una parte de la fase acuosa (en la cual es soluble formada por una mezcla de trietanolamina y metilparabeno, que por presentar un pH alcalino logró que el econazol nitrato se hidrolizará (liberando la base), y al mezclar la fase acuosa con la oleosa, el econazol, por coeficiente de difusión y afinidad, pasó a la fase oleosa y a las estructuras líquido-cristalinas [15].

Tabla 2. Composición de los sistemas

	Patrón 1	Muestra 1	Patrón 2	Muestra 2
Ác. esteárico	15,00 g	15,00 g	15,00 g	15,00 g
Vaselina	20,00 g	20,00 g	20,00 g	20,00 g
Propilparabeno	0,03 g	0,03 g	0,03 g	0,03 g
Trietanolamina	4,14 g	4,14 g	4,14 g	4,14 g
Metilparabeno	0,07 g	0,07 g	0,07 g	0,07 g
Nitrato de Econazol	---	1,00 g	---	1,00 g
Agua	60,76 g	60,76 g	60,76 g	60,76 g

a. Comportamiento reológico del sistema elegido (sistema N.º 3) sin y con el agregado de principio activo (econazol)

Las mediciones se realizaron con el mismo equipo y condiciones mencionadas en el ítem a del primer objetivo específico.

b. Observación microscópica con luz común y luz polarizada

La metodología aplicada fue la misma que la descrita en el ítem b del primer objetivo específico.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De lo adelantado experimentalmente se tendría lo siguiente según el cumplimiento de los objetivos propuestos:

Objetivo específico 1. Elección del sistema adecuado para la incorporación de un principio activo

a. Perfil reológico

Reológicamente, los sistemas con ácido esteárico hasta la relación molar 1:1 se comportaron como pseudoplásticos con ligera tixotropía (sistema 1 y 2). El sistema 3 (ver

figura 2) presenta comportamiento plástico y ligera tixotropía. Los sistemas con mayor cantidad de ácido esteárico (sistemas 4, 5 y 6) presentaron características plásticas sin tixotropía con viscosidades muy elevadas.

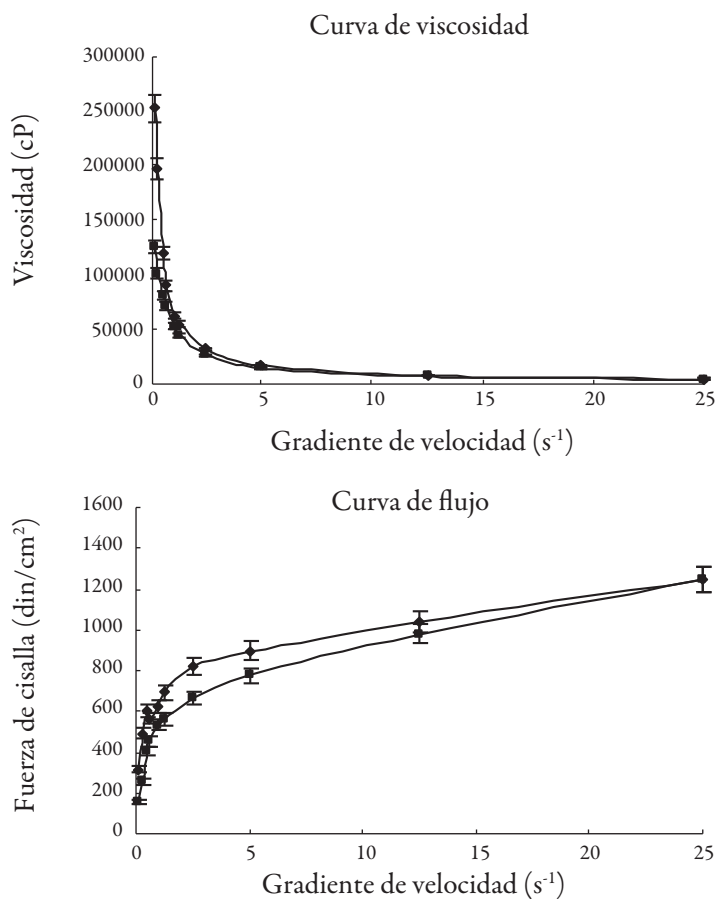


Figura 2. Perfil reológico del sistema 3

b. Observación microscópica

Los sistemas 3 y 4, observados al microscopio óptico con luz ordinaria y 200 aumentos (ver figura 3), mostraron una fase interna homogénea en cuanto al tamaño de los glóbulos de la fase oleosa; mientras que en los sistemas 1 y 2, el tamaño de los glóbulos de la fase interna presentaron mayor diámetro, por lo que se puede suponer una menor estabilidad. En los sistemas 4 y 5, si bien los glóbulos de la fase interna fueron homogéneos, sus viscosidades fueron demasiado elevadas por la alta concentración de ácido esteárico.

En todos los sistemas, bajo luz polarizada y con 200 aumentos, se observaron cruces de extinción característicos de la fase laminar líquido-cristalina (ver figura 4); los sistemas 3, 4 y 5 presentaron mayor cantidad de cristales líquidos.

Observadas las diluciones 1:10, al microscopio óptico con luz ordinaria y 200 aumentos (ver figura 5), los sistemas 3, 4, 5 y 6 presentaron gotas secundarias.

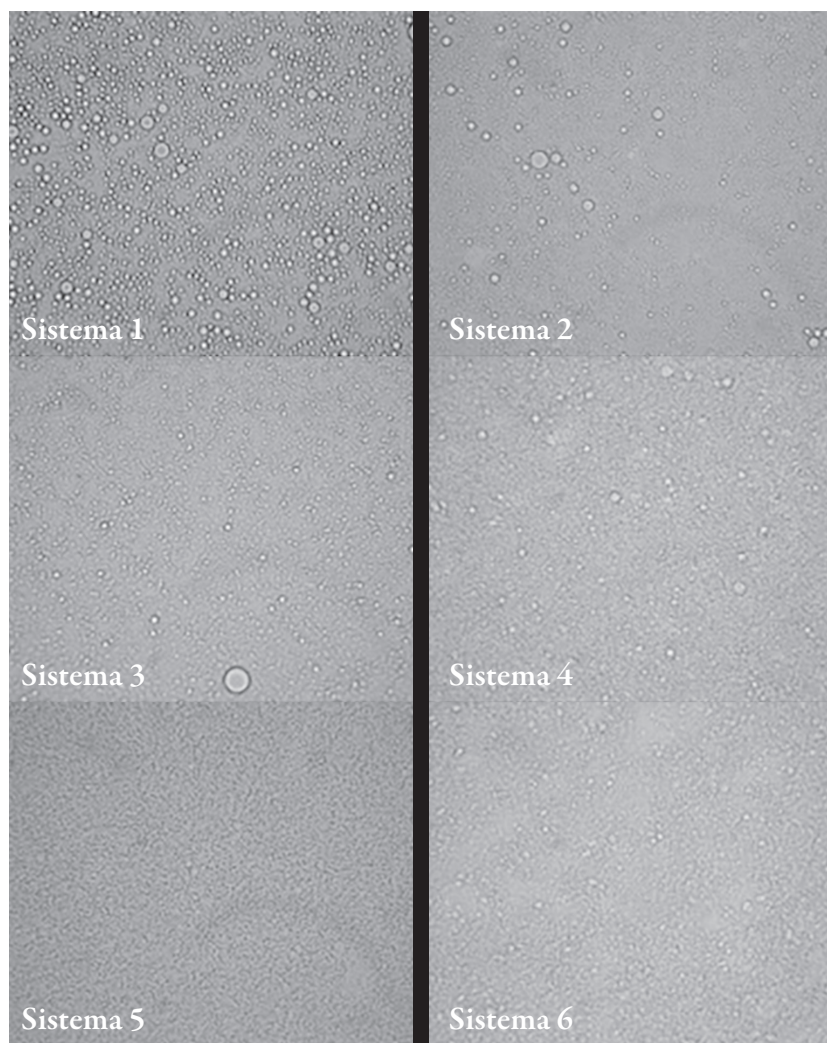


Figura 3. Microfotografías de los glóbulos de la fase interna, obtenidas con luz ordinaria y 200 aumentos

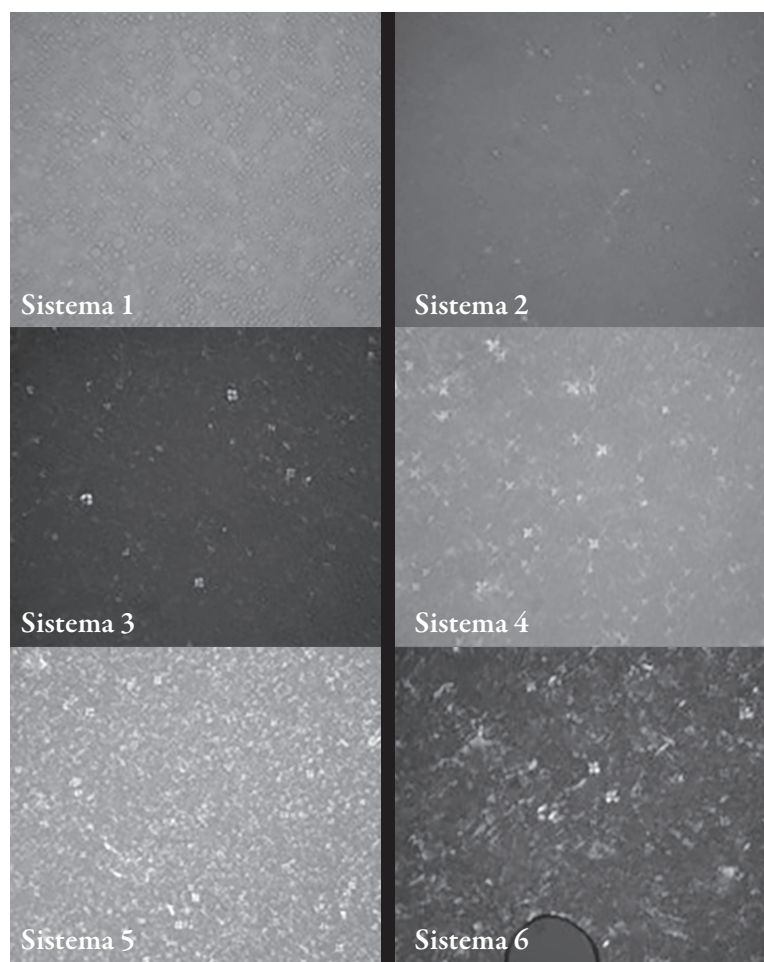


Figura 4. Microfotografías de los cristales líquidos obtenidas con luz polarizada y 200 aumentos

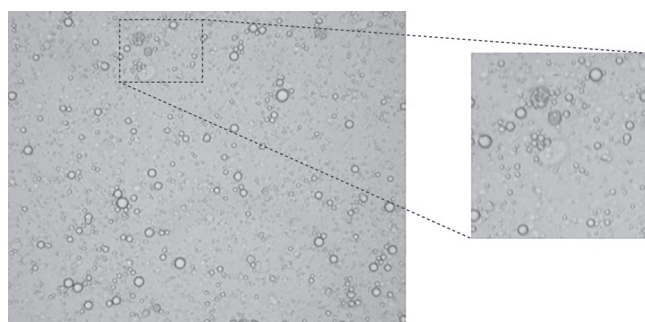


Figura 5. Sistema 3. Microfotografías de gotas secundarias obtenidas con luz ordinaria y 400 aumentos

c. Medición del HLB

Los valores de HLB de los sistemas estudiados estuvieron comprendidos entre 8,7 y 21 (ver tabla 3).

Tabla 3. Valores de HLB

	Sistema N. ° 1	Sistema N. ° 2	Sistema N. ° 3	Sistema N. ° 4	Sistema N. ° 5	Sistema N. ° 6
HLB	21	16,1	13,2	11,2	9,7	8,7

Cuando se utilizan tensioactivos con un HLB similar al HLB_R de la fase oleosa, se obtienen emulsiones con glóbulos pequeños de fase interna, baja viscosidad y una gran estabilidad. Por lo tanto, se puede observar que los sistemas 3 y 4 presentaron un HLB adecuado para la formación de una emulsión estable.

d. Estabilidad física

Los resultados obtenidos están detallados en la tabla 4. Los sistemas 1 y 2 mostraron separación de fases en los ensayos de estabilidad realizados. Los sistemas 3, 4, 5 y 6 demostraron ser estables, pese a que los sistemas 5 y 6 presentaron un HLB bajo con respecto al requerido; pero la alta viscosidad, la presencia de cristales líquidos y de gotas secundarias, contribuyeron a la estabilidad.

Tabla 4. Estabilidad física

	Sistema N. ° 1	Sistema N. ° 2	Sistema N. ° 3	Sistema N. ° 4	Sistema N. ° 5	Sistema N. ° 6
Centrifugación	Separación de fases	Separación de fases	Estable	Estable	Estable	Estable
Estrés térmico	Separación de fases	Separación de fases	Estable	Estable	Estable	Estable
Estabilidad física a 40 °C	Separación de fases	Separación de fases	Estable	Estable	Estable	Estable

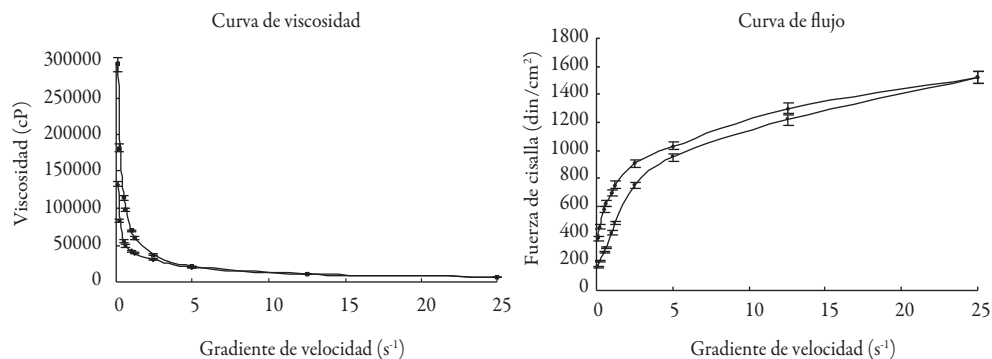
A partir de los ensayos realizados a los sistemas estudiados, podemos afirmar que los sistemas 3 y 4 fueron los apropiados por sus valores de HLB, viscosidad, presencia de cristales líquidos y gotas secundarias, factores (que aumentan la estabilidad de los sistemas). Se eligió el sistema N. ° 3 debido a sus óptimas características reológicas.

Objetivo específico 2. Preparación de las emulsiones

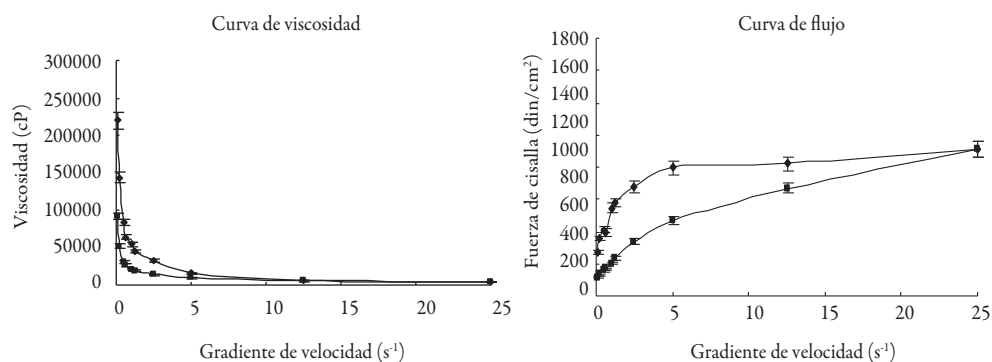
a. Comportamiento reológico del sistema elegido (sistema N. ° 3) sin y con el agregado de principio activo (econazol)

La variación de esta propiedad puede observarse en la figura 6 para todas las emulsiones preparadas.

Patrón 1. Emulsión convencional sin econazol



Muestra 1. Emulsión convencional con econazol



Patrón 2. Emulsión con cristales líquidos y sin econazol

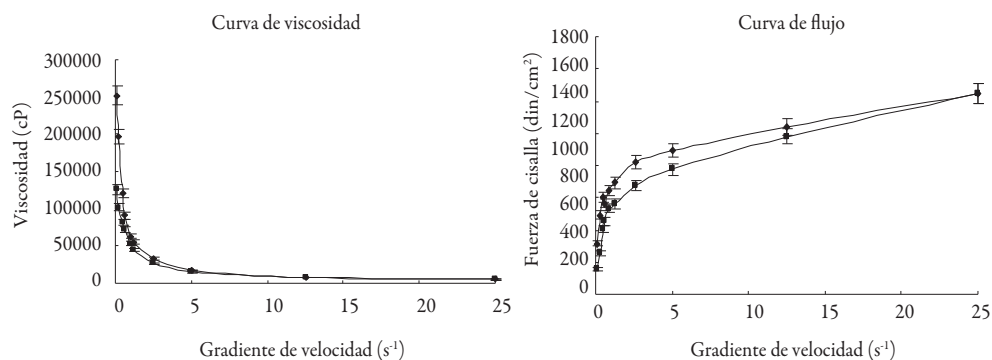


Figura 6. Comportamiento reológico de las formulaciones (*Continúa*)

Muestra 2. Emulsión con cristales líquidos y con econazol

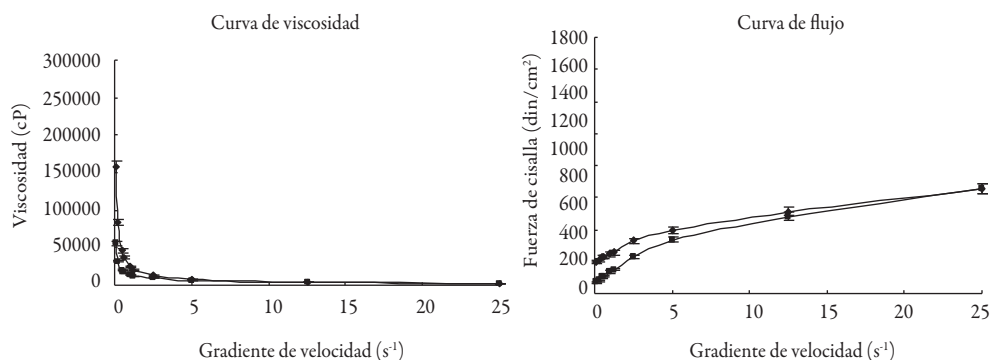


Figura 6. Comportamiento reológico de las formulaciones (*Continuación*)

Observamos en las gráficas que los cuatro sistemas son cuerpos plásticos con tixotropía. Los sistemas sin econazol, tanto la emulsión convencional como la emulsión con cristales líquidos, presentaron mayor viscosidad que los sistemas con econazol. Las emulsiones con cristales líquidos (con y sin econazol) presentaron menor tixotropía que las emulsiones convencionales.

b. Observación microscópica con luz común y luz polarizada

En los cuatro sistemas se observó un tamaño adecuado de glóbulos de fase interna. En las emulsiones preparadas por las técnicas de formación de estructuras líquido-cristalinas se observaron cruces de extinción.

Podemos concluir que se obtuvo un sistema emulsivo óptimo (sistema N.º 3), en cuanto a estabilidad, con presencia de estructuras líquido-cristalinas y comportamiento reológico. Se utilizó esa formulación para incorporar un principio activo liposoluble (econazol), preparándola por técnicas convencionales y de formación de cristales líquidos. La incorporación de econazol no modificó la presencia de cruces de extinción que identifica a los cristales líquidos. Además, se observó que estas son sistemas plásticos con tixotropía, y que al agregar econazol, tanto la viscosidad de la crema preparada por el método convencional como la viscosidad de la preparada con cristales líquidos disminuyeron ligeramente. A pesar de esas diferencias, los perfiles reológicos en cuanto a valores de viscosidad, de tixotropía y estabilidad son adecuados para formular una emulsión dermatológica. Esta conclusión nos alienta a continuar con la investigación referida, así el principio activo se incorpora no solamente en la fase oleosa, sino también en la fracción hidrocarbonada de los cristales líquidos, así como lo relativo al comportamiento cinético de liberación del mismo.

AGRADECIMIENTOS

Al Esp. Farm. Osvaldo Di Sapio de la Cátedra de Farmacobotánica de la Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas de la Universidad Nacional de Rosario, por permitirnos utilizar el microscopio polarizante y colaborar con la interpretación de las microfotografías de los distintos sistemas.

REFERENCIAS

1. R.C. Pasquali, C. Bregni, R. Serrao, Estructura de las principales fases líquido-cristalinas liotrópicas, *Acta Farm. Bonaerense*, **24**(3), 453-457 (2005).
2. R.C. Pasquali, "Estructuras líquido cristalinas y sus aplicaciones farmacéuticas y cosméticas", Tesis doctoral, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires, Argentina, 2006, p. 66.
3. S. Friberg, Liquid crystalline phases in emulsions, *J. Colloid Interf. Sci.*, **37**(2), 291-295 (1971).
4. G.M. Eccleston, Multiple-phase oil-in-water emulsions, *J. Soc. Cosmet. Chem.*, **41**, 1-22 (1990).
5. T. Engels, W. von Rybinski, Liquid crystalline surfactant phases in chemical applications, *Henkel-Referate*, **35**, 38-46 (1999).
6. T. Suzuki, H. Takei, S.J. Yamazaki, Formation of fine three-phase emulsions by the liquid crystal emulsification method with arginine β -branched monoalkyl phosphate, *J. Colloid Interf. Sci.*, **129**(2), 491-500 (1989).
7. H. Schott, "Remington: ciencia y práctica de la farmacia", Editado por Alfonso R. Gennaro, Editorial Médica Panamericana, Buenos Aires, 1995, vol. I, pp. 426-455.
8. T. Suzuki, H. Tsutsumi, A. Ishida, Secondary droplet emulsion: Mechanism and effects of liquid crystal formation in o/w emulsion, *J. Dispersion Sci. Technol.*, **5**(2), 119-141 (1984).
9. R.C. Pascuali, C. Bregni, Emulsiones líquida-cristalinas estabilizadas con estearato de trietanolamina y ácido esteárico: influencia del método de preparación en las propiedades y en la formación de gotas secundarias, *Ars Pharm.*, **47**(2), 219-237 (2006).

10. S.A. Lavaselli, "Estudio reológico de excipientes semisólidos y sus modificaciones por el agregado de distintas drogas", Tesis doctoral, Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, Universidad Nacional de Rosario, Argentina, 2002, pp. 72-81, 317-353.
11. R.C. Pasquali, C. Bregni, R. Serrao, Identificación de fases líquido cristalinas con el microscopio polarizante, *Cosmética, Rev. Asoc. Argent. Quím. Cosmét.*, **59**, 25-36 (2005).
12. P. Bustamante-Martínez, En: "Tratado de farmacia galénica", Luzan 5, S.A., Madrid, 1993, pp. 381-403.
13. J. Swarbrick, "Remington: ciencia y práctica de la farmacia", Editado por Alfonso R. Gennaro, Editorial Médica Panamericana, Buenos Aires, 1995, vol. I, pp. 405-425.
14. P. Bustamante-Martínez, En: "Tratado de farmacia galénica", Luzan 5, S.A., Madrid, 1993, pp. 423-446.
15. S. Lavaselli, C. Pedemonte, J. Mazon, G. Lillini, Di Sapio O, R, Pasquali, Liquid-crystalline emulsions with terbinafine sulfate for topical application, *Bio-cell*, **36**(1), A43 (2012).

Modelagem matemática do desempenho de sensores fotoeletroquímicos, baseados no eletrodo Ti/TiO₂

Volodymyr V. Tkach^{1*}, Reza Ojani², Ebrahim Zarei², Olena I. Aksimentyeva³, Vasyl ' V. Nechyporuk¹, Petró I. Yagodynets¹

¹ Universidade Nacional de Chernivtsi, 58012, Rua de Kotsyubyns'ky., 2, Chernivtsi, Ucrânia.
*Correio eletrônico: *nightwatcher2401@gmail.com*

² Universidade de Mazandarã, 47416-95447, 3º km. Rodovia de Forças Aéreas Iranianas, Babolsar, República Islâmica do Irã.

³ Universidade Nacional de L'viv, 79005, Rua de Kyryl e Mefodiy., 6, L'viv, Ucrânia.

Recibido para evaluación: 19 de febrero de 2015.

Aceptado para publicación: 25 de enero de 2016.

RESUMO

O desempenho de sensores fotoeletroquímicos, baseados no eletrodo Ti/TiO₂ (sendo um exemplo de modelagem o sensor de hidrazina), foi descrito matematicamente e o respectivo modelo foi analisado por meio de teoria de estabilidade linear e análise de bifurcações. As condições do melhor desempenho destes sensores, bem como as de instabilidades oscilatória e monotônica, foram inferidas na base da análise do modelo.

Palavras-chave: sensores, fotoeletrocatalise, dióxido de titânio, comportamento eletroquímico, estado estacionário estável

SUMMARY

The mathematical modeling of the function of the photoelectrochemical sensors, based on Ti/TiO₂ electrode

The work of photoelectrochemical sensors, based on the Ti/TiO₂ electrode (being an example for the modeling the hydrazine sensor), was described mathematically and the respective model was analyzed by means of linear stability theory and bifurcation analysis. The best response condition for this sensor, as also, the oscillatory and monotonic instabilities requirements, were inferred, basing on the model's analysis.

Keywords: Sensors, Photoelectrocatalysis, Titanium Dioxide, Electrochemical Behavior, Stable steady-state.

INTRODUÇÃO

Muitas pesquisas sobre o dióxido de titânio são relacionadas às suas aplicações para a degradação de vários compostos orgânicos sob a irradiação ultravioleta [1–6]. Só nalguns artigos foi investigado o uso de fotoeletrocatalise para a análise eletroquímica. Recentemente, para a detecção do ADN foi usado o eléctrodo de nanopartículas do óxido de estanho [7] e o eléctrodo de compósito $\text{TiO}_2/\text{CdS}/\text{ITO}$, para a detecção de fetoproteína [8]. Além disso, foram preparados os eléctrodos da pasta de carbono, modificados pela adsorção de azul de metileno sobre fosfato de zircônio [9] e muscovita [10]. Eles foram exitosamente usados para a oxidação fotoeletrocatalítica da Vitamina C. Outrossim, Xu e colaboradores [11] reportaram a possibilidade de uso de nova metodologia fotoeletroquímica da determinação de dinucleótido de nicotinamida e adenina (NADH) pelo eléctrodo do filme de TiO_2 sobre o eléctrodo de óxido de índio e de estanho (ITO).

Outros grupos de pesquisa também investigaram a oxidação fotoeletrocatalítica de NADH com o uso de novo eléctrodo polimérico de grafite, modificado por fenotiazina [12], o eléctrodo vítreo de carbono, modificado por poli(toluidino vermelho O) [13], bem como por meio doutros eléctrodos semelhantes [14–16]. Além disso, foram também usados os sensores, baseados nos compósitos de TiO_2 com polímeros condutores (polianilina [17, 18], polipirrol [19] e politiofeno [20]), que já obtiveram o seu uso em sensores eletroquímicos [21–28]. Zhang e colaboradores [29] desenvolveram o sensor fotoeletroquímico de glicose e sacarose, baseado no TiO_2/ITO .

Por outro lado, hidrazina e derivados são ótimos redutores para a síntese orgânica, inibição de corrosão, produção agrícola etc. [30, 31].

Há muitas descrições da determinação eletrocatalítica de hidrazina [1, 32–36] e no artigo [1] é descrito experimentalmente um novo método de detecção de hidrazina por meio do uso do eléctrodo de folha de titano, modificado pelo filme de TiO_2 .

Muitas vezes, nos sensores eletroquímicos foram observadas as instabilidades, capazes de influenciar o desempenho de sensores e biossensores eletroquímicos [21–28], sendo-lhes dada uma interpretação fenomenológica. Esta, porém, não pode ter um bom fundamento, por não ter base teórica, que só pode ser dada pelo modelo matemático, capaz de descrever matematicamente os processos no sistema.

Neste trabalho, o sensor de hidrazina, baseado no filme Ti/TiO₂ obtém-lhe a descrição matemática do desempenho, cujo alvo é a determinação de regiões topológicas do melhor desempenho, bem como das causas das possíveis instabilidades. Na segunda seção, descrever-se-á matematicamente o desempenho do sensor fotoeletrocatalítico, baseado no compósito TiO₂-polímero condutor.

SEÇÃO I. O DESEMPENHO DO TiO₂ PURO. O SISTEMA E O SEU MODELO

Para descrever matematicamente o desempenho do sensor fotoeletrocatalítico de hidrazina no modo potencioestático, usam-se as 2 variáveis (o caso da oxidação direta pelo buraco):

c – a concentração da hidrazina na camada pré-superficial;

θ – o grau da formação de buracos na superfície de TiO₂.

Para simplificar a modelagem, supõe-se que a solução esteja agitando-se intensamente, para menosprezar o fluxo de convecção, que o eletrólito de suporte esteja em excesso, para menosprezar o fluxo de migração. A camada pré-superficial é suposta a ser de espessura constante, igual a δ , e o perfil concentracional do analito (neste caso, hidrazina) na camada, a ser lineal.

Como sendo o material semiconductor oticamente ativo, o comportamento eletroquímico dele na luz e no escuro é diferente. Conforme o artigo [1], a eletrooxidação da hidrazina se dava na luz, portanto o modelo vai descrever o comportamento do mencionado composto nas condições de iluminação.

O analito aparece na camada pré-superficial por meio da difusão, e desaparece, sendo oxidado pelo buraco. Assim sendo, a sua equação de balanço será descrita como:

$$\frac{dc}{dt} = \frac{2}{\delta} \left(\frac{\Delta}{\delta} (C_0 - C) - r_i \right) \quad (1)$$

Sendo Δ o coeficiente de difusão, c_0 a concentração de hidrazina no interior da solução, r_i a velocidade de reação de oxidação de hidrazina pelo buraco.

Os buracos aparecem na superfície aquando da irradiação ultravioleta e desaparecem da superfície no processo de sobreoxidação, ultrapassando-se-lhes a margem elétrodo-solução. Assim sendo, a equação de balanço será descrita como:

$$\frac{d\theta}{dt} = \frac{1}{\Gamma_{\max}}(r_0 - r_1) \quad (2)$$

Sendo Γ_{\max} a concentração máxima de buracos na superfície e r_0 a velocidade da sua formação.

As velocidades das reações podem ser apresentadas como:

$$r_0 = k_0(1-\theta)\beta I \exp\left(\frac{F\varphi_0}{2}\right) r_1 = k_1 c \theta \quad (3-4)$$

Sendo k_n as constantes de velocidades das respectivas reações, β o coeficiente, cujo valor depende principalmente do rendimento quântico, comprimento da onda, natureza do analito e do meio (analogicamente ao caso da fotoiniciação da polimerização radical), I a intensidade da luz, F o número de faraday, φ_0 o salto do potencial na dupla camada elétrica, relativo ao potencial de carga zero. R é a constante universal de gases e T a temperatura absoluta.

O elemento exponencial descreve a influência da formação de buracos sobre a dupla camada.

RESULTADOS E DISCUSSÃO (SEÇÃO I)

O comportamento do sistema vai ser analisado por meio da teoria de estabilidade linear. A matriz funcional de Jacobi, cujos elementos são calculados para o estado estacionário, apresenta-se como:

$$\begin{pmatrix} a_{11} & a_{12} \\ a_{21} & a_{22} \end{pmatrix} \quad (5)$$

Sendo:

$$a_{11} = \frac{2}{\delta} \left(-k_1 \theta - \frac{\Delta}{\delta} \right)$$

$$a_{12} = \frac{2}{\delta} (-k_1 c)$$

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

$$a_{22} = \frac{1}{\Gamma_{\max}} \left(-k_0 \beta I \exp\left(\frac{F\varphi_0}{RT}\right) + k_0 (1-\theta) \alpha \beta I \exp\left(\frac{F\varphi_0}{RT}\right) - k_1 c \right) \quad (6-9)$$

Para simplificar a análise de jacobiano, introduzimos as novas variáveis de modo que o determinante da matriz se descreve como:

$$\frac{2}{\delta \Gamma_{\max}} \begin{vmatrix} -X-k & -U \\ -X & W-U \end{vmatrix} \quad (10)$$

Como a condição de $\text{Tr } J < 0$, em que $\text{Tr } J = -X - k + W - U$, é igual a é quase sempre satisfeita, a condição principal de estabilidade dos estados estacionários será:

$$kU > W(X+k) \quad (11)$$

Ou seja, caso a desapareição de buracos da superfície do filme dê maior impacto que a sua aparição, bem como o efeito deste aparecimento sobre a dupla camada elétrica (DCE), isto favorece a estabilidade do estado estacionário.

A zona de estabilidade de estado estacionário é correspondente à região do trecho linear na curva parâmetro eletroquímico – concentração. No caso da igualdade destes impactos, realiza-se a instabilidade monotônica

$$kU > W(X+k) \quad (12)$$

neste caso o voltamperograma apresena um trecho N-formado e o sistema existe namultiplicidade de estados estacionários, de que só escolhe um, sendo que ele se destrói após se mudarem as condições.

A instabilidade oscilatória existe, se na diagonal principal da matriz de Jacobi existem elementos positivos. O único elemento, capaz de ser positivo é W , que assim é, caso o efeito da formação de buracos sobre a DCE prevaleça sobre o efeito de diminuição de velocidade aquando do crescimento da quantidade dos buracos, promovendo assim o aumento autodeterminado da quantidade de buracos. Assim sendo, a única causa do comportamento oscilatório no sistema é o efeito da aparição de buracos sobre a dupla camada.

O caso do desempenho na presença de prótons. A investigação experimental, descrita em [1] confirma que o pH ótimo do desempenho do sensor descrito é igual a 7. O pH neutro também poderia ser inferido da natureza do dióxido de titânio, que é um composto

amfotérico e reage tanto com os ácidos, como com as bases. Outrossim, a forma diferente da parte esquerda do gráfico apresentado da direita pode ser explicada pelo fato de a hidrasina ser um composto básico.

O efeito de pH sobre o sistema pode ser descrito por meio do modelo matemático que, no caso, contém as 3 equações diferenciais:

$$\begin{cases} \frac{dc}{dt} = \frac{2}{\delta} \left(\frac{\Delta}{\delta} (c_0 - c) - r_1 - h_1 \right) \\ \frac{d\theta}{dt} = \frac{1}{\Gamma_{\max}} (r_0 - r_1 - h_2) \\ \frac{dh}{dt} = \frac{2}{\delta} \left(\frac{D}{\delta} (h_0 - h) - h_1 - h_2 - h_3 \right) \end{cases} \quad (13)$$

Sendo D o coeficiente de difusão de prótons, h_0 e h as concentrações de prótons, h_1 a velocidade da reação de prótons com hidrazina, h_2 a da reação de prótons com a zona do filme, em que são formados os buracos e h_3 a da reação de prótons com a zona do filme, livre de buracos.

$$\begin{aligned} h_1 &= k_{H1}hc, & h_2 &= k_{H2} \exp(-\beta\theta)h\theta, \\ h_3 &= k_{H3} \exp(-\beta(1-\theta)h(1-\theta)) \end{aligned} \quad (14 - 16)$$

A análise do sistema (13) é muito semelhante ao anterior e ao anteriormente descrito para o caso de sensores, baseados em polímeros condutores e para o oxihidróxido de cobalto ($\text{CoO}(\text{OH})$) – um material, análogo ao TiO_2 [37–42], portanto não será descrita detalhadamente. O aumento da concentração dos prótons, aliás, a diminuição de pH faz não favorece a estabilização do estado estacionário.

No caso de hidrazina, não há formação autocatalítica de prótons, portanto não haverá fator autocatalítico como causa do comportamento oscilatório. Porém, haja vista que a destruição parcial do filme no meio fortemente ácido é acompanhada pela interação atrativa de partículas do filme, esta será responsável pelo comportamento oscilatório, o que poderá ser representado em mais um elemento positivo na “casa” a_{22} da matriz.

No caso doutro analito, que deixa a formação autocatalítica de prótons, esta também será responsável pelas oscilações e o elemento a_{33} vai ter mais um componente positivo.

No meio alcalino, o modelo sofre alterações, não existindo a reação com o analito. Nele, porém, o dióxido de titânio também é parcialmente dissolvido, portanto lá o fator superficial também vai ser responsável pela possível aparição de oscilações.

CONCLUSÕES (SEÇÃO I)

1. A análise matemática mostra que o sensor fotoeletroquímico, baseado na folha de titânio, revestida pelo filme de dióxido de titânio, terá a resposta mais exata e interpretável no caso de a formação de buracos terem menor impacto que a oxidação de hidrazina por seu meio, o que vai ao encontro do descrito em [1].
2. Foi confirmada a presença de estruturas dissipativas temporais, cuja existência é mantida pela difusão de monômero e desaparecimento de buracos da superfície anódica. O comportamento oscilatório, em meio neutro, só pode ser causado pela influência sobre a CDE da formação de buracos.
3. Os meios fortemente ácidos e alcalinos não favorecem a estabilidade do estado estacionário estável. Em ambos os meios o filme pode ser parcialmente destruído (sendo isso a causa da diferença em recepção do analito, comparada ao meio neutro). O comportamento oscilatório, em ambos os meios, pode ser causado pela atração de partículas do filme, no momento da destruição parcial, e, em meio ácido, pela formação autocatalítica de prótons, caso a haja.

SEÇÃO II. A DESCRIÇÃO MATEMÁTICA DO DESEMPENHO DE SENSORES, BASEADOS NOS COMPÓSITOS DE TiO_2 COM POLÍMEROS CONDUTORES

Neste caso, entre o sistema reacional e o elétrico tem uma camada fina do polímero condutor, que age como mediador. De fato, tratar-se-á de um modelo, semelhante aos descritos em [37–42].

O analito aparece na camada pré-superficial por meio da difusão, e desaparece, sendo oxidado pelo buraco. Assim sendo a sua equação de balanço será descrita como:

$$\frac{dc}{dt} = \frac{2}{\delta} \left(\frac{\Delta}{\delta} (c_0 - c) - r_1 \right) \quad (17)$$

Sendo Δ o coeficiente de difusão, c_0 a concentração de hidrazina no interior da solução, r_1 a velocidade de reação de oxidação de hidrazina pelo buraco.

Os buracos aparecem na superfície aquando da irradiação ultravioleta e desaparecem da superfície no processo de sobreoxidação, ultrapassando-se-lhes a margem eletrodo-solução. Assim sendo, a equação de balanço será descrita como:

$$\frac{d\theta}{dt} = \frac{1}{\Gamma_{\max}}(r_0 - r_1) \quad (18)$$

Sendo Γ_{\max} a concentração máxima de buracos na superfície e r_0 a velocidade da sua formação.

O polímero condutor é reduzido aquando da formação de buracos e oxidado eletroquimicamente, finalizando, destarte, a transferência de elétron. Assim sendo, a equação de balanço será descrita como:

$$\frac{d\theta_p}{dt} = \frac{1}{G_{\max}}(r_0 - r_2) \quad (19)$$

Sendo G_{\max} a concentração máxima do polímero.

As velocidades das reações, neste caso, podem calcular-se como:

$$r_0 = k_0(1-\theta)(1-\theta_p)\beta I \exp\left(\frac{F\varphi_0}{RT}\right); r_1 = k_1c\theta; r_2 = k_2\theta_p \exp\left(\frac{zF\varphi_0}{RT}\right) \quad (20 - 22)$$

Sendo z a quantidade de elétrons transferidos pelo polímero condutor.

RESULTADOS E DISCUSSÃO (SEÇÃO II)

Analisar-se-á o comportamento do sistema de equações diferenciais (17–19) por meio da teoria de estabilidade linear. A matriz funcional de Jacobi, cujos elementos são calculados para o estado estacionário, pode ser apresentada como:

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

Sendo:

$$a_{11} = \frac{2}{\delta} \left(-k_1\theta - \frac{\Delta}{\delta} \right); a_{12} = \frac{2}{\delta} (-k_1c); a_{13} = 0$$

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

$$a_{22} = \frac{1}{\Gamma_{\max}} \left(-k_0\beta I (1-\theta_p) \exp\left(\frac{F\varphi_0}{RT}\right) + k_0(1-\theta)(1-\theta_p)\alpha\beta I \exp\left(\frac{F\varphi_0}{RT}\right) - k_1c \right)$$

$$\begin{aligned}
a_{23} &= \frac{1}{\Gamma_{\max}} \left(-k_1 c (1 - \theta_p) \right); \quad a_{31} = 0 \\
a_{32} &= \frac{1}{G_{\max}} \left(-k_0 \beta I (1 - \theta_p) \exp\left(\frac{F\varphi_0}{RT}\right) + k_0 (1 - \theta) (1 - \theta_p) \alpha \beta I \exp\left(\frac{F\varphi_0}{RT}\right) \right) \\
a_{33} &= \frac{1}{\Gamma_{\max}} \left(-k_1 c (1 - \theta_p) - k_2 \exp\left(\frac{zF\varphi_0}{RT}\right) - k_2 \theta_p \gamma \exp\left(\frac{zF\varphi_0}{RT}\right) \right)
\end{aligned} \tag{24 - 32}$$

Sendo γ o coeficiente que mostra relações entre φ_0 e θ .

Com a introdução de novas variáveis, o determinante do jacobiano será descrito como:

$$\frac{2}{\delta_{\max} G_{\max}} \begin{vmatrix} -X - k & -U & 0 \\ -X & W - U & -\xi \\ 0 & -U & -\xi - \Sigma \end{vmatrix} \tag{33}$$

A utilização do critério de Routh e Hurwitz de estabilidade de estado estacionário poderá dar a condição desta, expressa sob a forma:

$$(X + k)(U + W\xi + W\Sigma) < kU(\xi + \Sigma) \tag{34}$$

O que pode significar que, para o estado estacionário ser estável, o aumento da quantidade de buracos e da sua influência sobre a DCE deve acompanhar-se pelo aumento da velocidade de eletropolimerização e da influência sobre a DCE deste processo, sendo que o segundo processo a afeta mais.

No caso da igualdade de influências dos processos mencionados, acontece a bifurcação de sela e nó, sendo que ela se descreve como:

$$(X + k)(U + W\xi + W\Sigma) = kU(\xi + \Sigma) \tag{35}$$

Para este sistema, como para o anteriormente descrito, uma das causas do comportamento oscilatório são as influências da formação de buracos para a dupla camada. Outra causa são as influências da oxidação da forma reduzida do polímero condutor, mostrada pela negatividade da variável Σ . As reações autocatalíticas, como não são características para os sensores de tal tipo de analito, não fazem parte do presente modelo.

O segundo fator é típico para os sistemas de sensores eletroquímicos, baseados em polímeros condutores. O primeiro, para os sistemas com o uso de TiO_2 . Dessarte, nos

sistemas em que os filmes de dióxido de titânio e polímero condutor atuam juntos, os fatores do comportamento também vão ser caraterísticos para ambos os filmes.

CONCLUSÕES (SEÇÃO II)

1. O comportamento do sistema com o sensor na base do elétron da folha de titânio (ou doutro metal), revestido pelo compósito TiO_2 /polímero condutor é mais complicado que no sistema da folha de titânio, revestida por TiO_2 , pois o comportamento do polímero condutor no processo da mediação da transferência de elétron também toma o papel importante.
2. O fator da influência do polímero condutor sobre a dupla camada toma papel importante na estabilidade de estado estacionário e na formação de instabilidade monotônica.
3. O comportamento oscilatório pode ser causado pelo fator da influência sobre a dupla camada de 2 etapas da transferência de elétron.
4. Foi confirmada a presença de estruturas dissipativas temporais no sistema. A sua existência mantém-se pela difusão do analito e pela etapa final da transferência de elétron.
5. O comportamento do sistema, em feitos gerais, é sumário do comportamento dos sistemas com filmes de TiO_2 e com os PC.

REFERÊNCIAS

1. R. Ojani, E. Zarei. A new and simple electrochemically assisted photocatalysis sensor of hydrazine using a Ti/TiO_2 Electrode, *J. Braz. Chem. Soc.*, **24**, 657 (2013).
2. S.M.A. Jorge, J.J. Sene, Photoelectrocatalytic treatment of p-nitrophenol using Ti/TiO_2 thin-film electrode, *J. Photochem. Photobiol.*, **174**, 71 (2005).
3. M.M. Pascoal-Fabiana, A. Anderson-Marc, M. Valnice. B. Zanoni, Photoelectrocatalytic oxidation of anionic surfactant used in leather industry on nanoporous Ti/TiO_2 eletrodes, *J. Braz. Chem. Soc.*, **19**, 803 (2008).
4. J. Shang, S. Xie, T. Zhu, J. Li, Solid-state, planar photoelectrocatalytic devices using a nanosized TiO_2 layer, *Environm. Sci. Technol.*, **41**, 7876 (2007).

5. G. Li, T. An, J. Chen *et al.*, Photoelectrocatalytic decontamination of oilfield produced wastewater containing refractory organic pollutants in the presence of high concentration of chloride ions, *J. Hazard Mat. B.*, **138**, 392 (2006).
6. B. Su, Y. Ma, Y. Du, C. Wang, Study of photoelectrocatalytic degradation behavior of p-nitrophenol with nano-TiO₂ modified film at a rotating ring-disk electrode, *Electrochem. Commun.*, **11**, 1154 (2009).
7. S. Liu, C. Li, J. Cheng, Y. Zhou, Selective photoelectrochemical detection of DNA with high-affinity metallointercalator and tin oxide nanoparticle electrode, *Anal. Chem.*, **78**, 4722 (2006).
8. G. Wang, J. Xu, H. Chen, S. Fu, Label-free photoelectrochemical immunoassay for α -fetoprotein detection based on TiO₂/CdS hybrid, *Biosens. Bioelectr.*, **25**, 791 (2009).
9. Y. Dilgin, Z. Dursun, G. Nisli, L. Gorton, Label-free photoelectrochemical immunoassay for α -fetoprotein detection based on TiO₂/CdS hybrid, *Anal. Chim. Acta*, **542**, 162 (2005).
10. Y. Dilgin, Z. Dursun, G. Nisli, Flow injection amperometric determination of ascorbic acid using a photoelectrochemical reaction after immobilization of methylene blue on muscovite, *Turk. J. Chem.*, **27**, 167 (2003).
11. G.L. Wang, J.J. Xu, H.Y. Chen, Label-free photoelectrochemical immunoassay for alpha-fetoprotein detection based on TiO₂/CdS hybrid, *Biosens. Bioelectron.*, **24**, 2494 (2009).
12. Y. Dilgin, L. Gorton, G. Nisli, Photoelectrocatalytic oxidation of NADH with electropolymerized toluidine blue O, *Electroanal.*, **19**, 286 (2007).
13. D. Gligor, Y. Dilgin, I.C. Popescu, L. Gorton, Poly-phenothiazine derivative-modified glassy carbon electrode for NADH electrocatalytic oxidation, *Electrochim. Acta*, **54**, 3124 (2009).
14. D. Dilgin, D. Gligor, H. Gökçel *et al.*, Photoelectrocatalytic oxidation of NADH in a flow injection analysis system using a poly-hematoxylin modified glassy carbon electrode, *Biosens. Bioelectron.*, **26**, 4111 (2010).
15. Y. Dilgin, D.G. Dilgin, Z. Dursun *et al.*, Photoelectrocatalytic determination of NADH in a flow injection system with electropolymerized methylene blue, *Electrochim. Acta*, **56**, 1138 (2010).

16. D.G. Dilgin, D. Gligor, H. Gökçel *et al.*, Glassy carbon electrode modified with poly-Neutral Red for photoelectrocatalytic oxidation of NADH, *Microchim. Acta*, **173**, 469 (2011).
17. W. Ma, D. Han, S. Gan *et al.*, Rapid and specific sensing of gallic acid with a photoelectrochemical platform based on polyaniline–reduced graphene oxide–TiO₂, *Chem. Comm.*, **49**, 7842 (2013).
18. J. Yun, S. Jeon, H.-I. Kim, Improvement of NO gas sensing properties of polyaniline/MWCNT composite by photocatalytic effect of TiO₂, *J. Nanomat.*, ID 184345 (2013).
19. R.N. Bulakhe, S.V. Patil, P.R. Desmukh *et al.*, Fabrication and performance of polypyrrole (Ppy)/TiO₂ heterojunction for room temperature operated LPG sensor, *Sens. Act. B*, **181**, 417 (2013).
20. M. Kimura, R. Sakai, S. Sato *et al.*, Sensing of vaporous organic compounds by TiO₂ porous films covered with polythiophene layers, *Adv. Funct. Mat.*, **22**, 469 (2012).
21. V.M. Andrade, “Confecção de biossensores através da imobilização de biocomponentes por eletropolimerização de pirrol”, Tés. M. Eng. UFRGS., Porto Alegre, 2006.
22. J.P. Tosar Rovira, “Estudio de la inmovilización de oligonucleótidos a elétrodos modificados de oro: polipirrol, y detección electroquímica de secuencias complementarias”, Tés. Lic. Bioquím., Universidad de la República, Montevideo, 2008.
23. R. Singh, Prospects of organic conducting polymer modified electrodes: Enzymosensors, *Int. J. Electrochem.*, ID 502707 (2012).
24. D. Zane, G.B. Appetecchi, C. Bianchini *et al.*, An impedimetric glucose biosensor on overoxidized polypyrrole thin film, *Electroanal.*, **23**, 1134 (2011).
25. T. McQuade, A. Pullen, T.M. Swager, Conjugated polymer-based chemical sensors, *Chem. Rev.*, **100**, 2537 (2000).
26. O. Korostynska, K. Arshak, E. Gill, A. Arshak, Review on state-of-the-art in polymer based pH sensors, *Sensors*, **7**, 3027 (2008).
27. Y. Oztekin, A. Ramanaviciene, Z. Yazicigil, A.O. Solak, A. Ramanavicius, Direct electron transfer from glucose oxidase immobilized on polyphenanthroline-modified glassy carbon electrode, *Biosens. Bioelectr.*, **26**, 2541 (2011).

28. A. Ramanavicius, A. Ramanaviciene, A. Malinauskas, Electrochemical sensors, based on conducting polymer polypyrrole, *Electrochim Acta*, **51**, 6025 (2006).
29. L. Li, Z. Zhang, H. Zhao, Electrochemical sensors based on conducting polymer—polypyrrole, *J. Electroanal. Chem.*, **656**, 211 (2011).
30. E.R. Riegel, “Riegel’s Handbook of Industrial Chemistry”, Kluwer Academic Plenum Publishers, New York, 2003.
31. S.M. Golabi, H.R. Zare, Electrocatalytic oxidation of hydrazine at glassy carbon electrode modified with electrodeposited film derived from caffeic acid, *Electroanal.*, **11**, 1293 (1999).
32. B. Fang, C. Zhang, W. Zhang, G. Wang, A novel hydrazine electrochemical sensor based on a carbon nanotube-wired ZnO nanoflower-modified electrode, *Electrochim. Acta*, **55**, 178 (2009).
33. A. Salimi, L. Miranzadeh, R. Hallaj, Amperometric and voltammetric detection of hydrazine using glassy carbon electrodes modified with carbon nanotubes and catechol derivatives, *Talanta*, **75**, 147 (2008).
34. V. Rosca, M.T.M. Koper, Electrocatalytic oxidation of hydrazine on platinum electrodes in alkaline solutions, *Electrochim. Acta*, **53**, 5199 (2008).
35. Q. Yi, W. Yu, Nanoporous gold particles modified titanium electrode for hydrazine oxidation, *Electroanal. Chem.*, **633**, 159 (2009).
36. Ç. Koçak, A. Altin, B. Aslisen, S. Koçak, Electrochemical preparation and characterization of gold and platinum nanoparticles modified poly(taurine) film electrode and its application to hydrazine determination, *Int. J. Electrochem.*, **11**, 233 (2016).
37. V.V. Tkach, B.K. Swamy, R. Ojani, M. Blanes, P. Yagodynets’, El mecanismo de la oxidación de omeprazol sobre el electrodo de carbono vitroso, modificado por polializarina, y su descripción matemática, *Orbital Elec. J. Chem.*, **7**, 1 (2015).
38. 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. Cien. Quím. Farm.*, **44**, 148 (2015).
39. 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).

40. 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).
41. V. Tkach, V. Nechyporuk, P. Yagodynets, El estudio de estabilidad en el proceso del desempeño de los sensores y biossensores, basados en los polímeros conductores en medio fuertemente ácido, *Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm.*, **42**, 30 (2013).
42. V. Tkach, S.C. de Oliveira, G. Maia *et al.*, The mathematical investigation for the oxidation of phenolic compounds over CoO(OH) in alkaline solution, *Mor. J. Chem.*, **4**, 112 (2016).

Estudio de utilización de antibióticos en el servicio de consulta externa de un hospital público en Bogotá, D.C.

José Julián López^{1*}, Adriana Marcela Garay¹

¹ Grupo de investigación RAM: Red para el Uso Adecuado de Medicamentos, Departamento de Farmacia, Universidad Nacional de Colombia, Carrera 30 N°. 45-03, Bogotá D. C., Colombia.

* Correo electrónico: jjlopezg@unal.edu.co

Recibido para evaluación: 16 de marzo de 2015.

Aceptado para publicación: febrero 1 de 2016.

RESUMEN

Se realizó un estudio de utilización de medicamentos sobre hábitos y calidad de la prescripción, con el fin de describir las características y potencial uso no adecuado de los antibióticos en el servicio de consulta externa de un hospital de segundo nivel de la ciudad de Bogotá, D.C. En las 8077 prescripciones analizadas se encontraron 613 (8%) con al menos un antibiótico de uso sistémico. Los antibióticos más dispensados fueron: Amoxicilina, Cefalexina, Ciprofloxacina, Dicloxacilina, Doxiciclina. Se prescribieron combinaciones de dos antibióticos en el 3% de las fórmulas, siendo la más frecuente macrólido-penicilina. Todas las prescripciones analizadas cumplieron con los requisitos de calidad y el 0,4% de los tratamientos no tenían el tiempo de duración del tratamiento. La frecuencia de uso de los antibióticos en el servicio de consulta externa fue más baja que en otros estudios. Se identificaron potenciales usos no adecuados como la falta de diagnóstico infeccioso, combinación de antibióticos no documentada, interacciones de medicamentos y falta de información adecuada en la administración de tetraciclinas.

Palabras clave: Farmacoepidemiología, estudio de utilización de medicamentos, antibióticos, hábitos de prescripción.

SUMMARY

Study of the use of antibiotics in the outpatient service of a public hospital in Bogotá, D. C.

A study on drug use habits and quality of prescribing was conducted to describe the characteristics and potential inadequate use of antibiotics in the outpatient service of one of the Bogotá's second-level hospitals. In 8077 prescriptions analyzed it was found 613 (8%) with at least one antibiotic for systemic use. Amoxicillin, Cephalexin, Ciprofloxacin, Dicloxacillin, and Doxycycline were the most dispensed antibiotics. Combinations of two antibiotics were prescribed for 3% of the formulas; the most common of these was macrolide-penicillin. All prescriptions analyzed met the quality requirements and only 0.4% of the treatments did not have the time duration of treatment. The found frequency of use of antibiotics in outpatient services was lower than in other studies. Potential not suitable uses as the lack of infectious diagnosis, antibiotic combination unreported, drug interactions and lack of adequate information on the administration of tetracyclines were identified.

Key words: Pharmaco-epidemiology, Drug utilization study, Antibiotics, Prescription patterns.

INTRODUCCIÓN

La Organización Mundial de la Salud (OMS) define el uso racional de medicamentos como la situación mediante la cual los pacientes reciben medicamentos apropiados a sus necesidades clínicas, en la dosis requerida, por el período adecuado y a un costo accesible [1]. Los actores que participan en el uso adecuado de medicamentos son aquellos que tienen la facultad para prescribir (médicos, odontólogos, etc.), aquellos que dispensan el medicamento (personal de la Farmacia), y finalmente, los usuarios (pacientes). Las estrategias de intervención para asegurar el uso apropiado de antibióticos se han enfocado principalmente en los prescriptores de hospitales y servicios de atención primaria, y en parte en los dispensadores y en la comunidad. El uso no adecuado de los antibióticos puede ocasionar problemas de salud pública como la resistencia bacteriana, por la aparición de infecciones de difícil tratamiento y el aumento de resistencia antibiótica con una importante morbilidad y mortalidad y la presencia de reacciones adversas, lo cual acarrea resultados clínicos y económicos desfavorables [2].

La capacidad de los microorganismos para sobrevivir en medios adversos está muy bien documentada, como es el caso de los múltiples mecanismos desarrollados por las bacterias para hacer frente a los medicamentos. Una de las estrategias disponibles para

disminuir el ascenso de este problema tiene que ver con el diseño e implementación de programas que restrinjan el uso masivo o no adecuado de los antibióticos con el fin de disminuir la exposición y así evitar la presión selectiva sobre los microorganismos [3].

Cualquier utilización de medicamentos antimicrobianos (apropiados o no) aplica una presión selectiva sobre las poblaciones de microorganismos trayendo consecuencias no solo sobre la morbilidad sino en aspectos económicos. En este último aspecto, en Colombia se desarrolló un estudio para evaluar las consecuencias económicas de la resistencia a metilicina donde se encontró que el total facturado por la hospitalización representado en los costos de la estancia en cuidados intensivos, los antibióticos, los líquidos parenterales, los exámenes de laboratorio y la terapia respiratoria fueron significativamente mayores comparados con un grupo con microorganismos sensibles [4–6].

La resistencia a los antimicrobianos ocurre cuando un microorganismo no responde a un antimicrobiano al que originalmente era sensible. Estos microorganismos pueden sobrevivir a la presencia de estos medicamentos, de tal forma que los tratamientos de primera línea dejan de ser eficaces aumentando el riesgo de propagación. La aparición de cepas resistentes es un fenómeno natural (mutación espontánea), pero el uso no adecuado de antimicrobianos, las malas prácticas en el control de las infecciones y la manipulación de alimentos sumado a condiciones sanitarias deficientes, propician la diseminación de esta resistencia. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), la “resistencia a los antibióticos” tiene que ver concretamente con la resistencia que desarrollan las bacterias comunes causantes de infecciones, mientras que el término “resistencia a los antimicrobianos” comprende no solo la resistencia a los antibióticos sino a los antifúngicos, antiparasitarios y antivirales [7].

Existen dos tipos de mecanismos de resistencia bacteriana. Los intrínsecos que habilitan a la bacteria para que produzca enzimas que inactivan el antibiótico, exprese bombas de eflujo que expulsan el fármaco, modifiquen el sitio blanco del antimicrobiano o generen una vía metabólica alterna que evite la acción del fármaco. El segundo mecanismo es el adaptativo ocasionado por el estado metabólico de la bacteria o por su capacidad de producir biopelículas [8].

En Latinoamérica es común que sus habitantes consigan antibióticos sin que medie una prescripción médica, debido a la carencia de leyes reguladoras que permiten su venta libre. Además, la automedicación y la carencia de mecanismos de inspección, vigilancia y control constituyen un serio problema que facilita la aparición de resistencias. En este sentido, se han realizado algunos estudios sobre el uso de antibióticos en consulta externa con el fin de caracterizar los patrones de prescripción e identificar potenciales problemas, los cuales servirán de referencia para comparar los resultados de este estudio [9–13].

El Hospital donde se realizó el presente estudio es una Institución Prestadora de Salud (IPS) de mediana complejidad y de carácter público, perteneciente a la Red de hospitales del Distrito Capital, localizada en el noroccidente de Bogotá D. C., en el cual se atiende población con nivel socio económico predominantemente de estratos 1 y 2.

Debido al desconocimiento de la magnitud y las características de prescripción de los antibióticos, teniendo en cuenta que existe una guía sobre el uso prudente de antibióticos que aplica para este hospital [14], se hace necesario la realización de un estudio que evidencie el estado actual de uso de este grupo terapéutico.

METODOLOGÍA

Se realizó un estudio observacional descriptivo de corte transversal y temporalidad retrospectiva durante el 1 de septiembre al 31 octubre del año 2013. Este diseño corresponde a un estudio sobre hábitos de prescripción en el que se describen además las características de calidad de la prescripción. Se incluyeron las prescripciones de pacientes mayores de 18 años que acudieron al servicio de Medicina Externa durante el periodo de estudio y que tuvieran al menos un antibiótico de uso sistémico. No se establecieron criterios de exclusión. Debido al carácter descriptivo del estudio y al volumen de prescripción, no se realizó cálculo del tamaño de muestra. Se tomó la información del total de prescripciones que cumplen los criterios de inclusión correspondientes al total de fórmulas dispensadas en el periodo de estudio (censo).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Características de la población

De las prescripciones que fueron dispensadas en el Servicio de Consulta Externa del Hospital durante el periodo de estudio; 613 cumplieron los criterios de inclusión. Estas prescripciones corresponden a una población con una tendencia mayoritaria de menores de 65 años con predominio del género femenino (66%). En la figura 1 se observan el histograma con la distribución por grupos de edad.

La mayor presencia de mujeres en la muestra estudiada puede ser explicada por la presencia de Infección de Vías Urinarias (IVU); ya que es un problema frecuente en la atención primaria y se presenta principalmente en el género femenino, debido a las características anatómicas de las estructuras urinarias en la mujer y a la flora bacteriana aumentada que presenta la región genital [15].

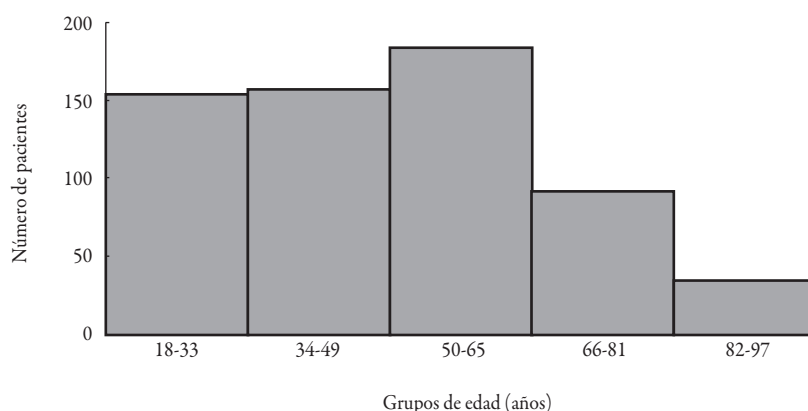


Figura 1. Distribución por grupos de edad

En cuanto a la edad se puede observar frecuencias similares en los tres primeros grupos etéreos posiblemente asociados al diagnóstico (IVU, enfermedades de la cavidad bucal, infecciones agudas de las vías respiratorias superiores, etc.).

Diagnósticos

Se encontró que el 22% de los diagnósticos (CIE-10) afectan el sistema genitourinario y corresponden a IVU (66%), enfermedades de los órganos genitales masculinos (12%) y enfermedades inflamatorias de los órganos pélvicos femeninos (9%).

El 18% de los diagnósticos pertenecen a enfermedades del sistema digestivo, que corresponden a enfermedades de la cavidad bucal (82%) y enfermedades del esófago, estómago y duodeno (12%).

Las enfermedades del sistema respiratorio son el 16% de los diagnósticos que corresponden a: infecciones agudas de las vías respiratorias superiores (59%), enfermedades crónicas de las vías respiratorias inferiores (17%), otras infecciones agudas de las vías respiratorias inferiores (16%).

Las enfermedades de la piel y el tejido subcutáneo corresponden al 12% de los diagnósticos, donde se encuentran las infecciones de la piel y del tejido subcutáneo (38%), absceso cutáneo, furúnculo y carbunco (27%) y los trastornos de las faneras (19%).

El restante 32% de los diagnósticos infecciosos se encuentran representados en traumatismos y envenenamientos, enfermedades del sistema circulatorio, ciertas enfermedades infecciosas y parasitarias y otras. Los diagnósticos más frecuentes con prescripción antibiótica fueron: IVU (15%), seguido de periodontitis (6%), faringoamigdalitis (5%) y celulitis (4%).

Se destaca que en el 18% de las prescripciones no tenían consignado un diagnóstico infeccioso, lo cual pudo ser ocasionado por mayor relevancia del diagnóstico principal (por ejemplo: diabetes mellitus, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, lupus eritematoso sistémico, etc.), probablemente asociado a un uso profiláctico o a la utilización empírica de un antibiótico sin confirmar un diagnóstico infeccioso. En cualquier caso, este es un hallazgo relevante en la investigación que identifica un potencial problema con el uso de estos medicamentos ya que si descartamos las posibles causas anteriormente mencionadas, puede significar que en algunos casos, los antibióticos son utilizados sin tener una certeza diagnóstica en situaciones que no comprometen el estado vital del paciente. En la tabla 1 se pueden observar la distribución de estos diagnósticos.

Tabla 1. Frecuencia de los diagnósticos identificados en el servicio de Consulta Externa

Diagnósticos	Porcentaje
IVU	15%
Periodontitis	6%
Faringoamigdalitis	5%
Celulitis	4%
Absceso cutáneo, furúnculo y carbunco	3%
Heridas	3%
No se identificó diagnóstico infeccioso	18%
EPOC sobreinfectada	2%
Otros	44%

Estos hallazgos de diagnósticos infecciosos están acordes con el nivel de complejidad del hospital ya que son las de mayor prevalencia en consulta externa y además se puede hacer uso de antibióticos para su tratamiento [14, 15].

Prevalencia de prescripción de antibióticos

De las fórmulas dispensadas en el período de estudio se obtiene un 8% (613/8077) de prescripciones con al menos un antibiótico de uso sistémico (grupo J en la clasificación ATC). Este porcentaje es bajo en comparación con estudios realizados en consulta externa: en un Hospital de Bogotá en donde reportan un porcentaje de utilización del 13,8% [9]; en 5 EPS de Colombia donde el porcentaje de utilización de antibióticos es del 11,8% [10]; en un Hospital de Lima donde los antibióticos representaron el 13,53% de las prescripciones [11, 12].

Aunque el porcentaje encontrado es bajo en comparación con los anteriores estudios, esto puede ser explicado por las diferencias en el régimen de salud, el carácter de las

instituciones (privadas, públicas) y los aspectos sociales y demográficos de la población atendida entre otras.

Número de antibióticos por prescripción

Del total de prescripciones que contenían antibióticos, el 97% (595/613) tenían un antibiótico formulado y el 3% (18/613) contenían dos antibióticos. Lo recomendado para atención ambulatoria es un antibiótico por prescripción porque esto permite una mejor adherencia a la terapia, disminución de efectos adversos y una reducción de las resistencias y los costos [14].

Prescripción de antibióticos

Prevalencia de uso. En las 631 prescripciones que contenían por lo menos un antibiótico, se identificaron 21 principios activos diferentes. En la tabla 2 se muestra la frecuencia de uso por grupo de antibiótico, mientras que la tabla 3 se consigna la información de los antibióticos individuales.

Los antibióticos beta-lactámicos (penicilinas y cefalosporinas) fueron lo más prescritos (48,2%), y de ellos la amoxicilina ocupó el primer lugar (63%), seguido en su orden por la dicloxacilina (27%), penicilina benzatínica (6%), ampicilina (3%) y otros con una frecuencia del 2% o menos. Estos resultados concuerdan con las recomendaciones de este grupo farmacológico como primera opción para la mayoría de las patologías que se presentan en la atención primaria (14). Para el grupo de las cefalosporinas, la cefalexina fue la más prescrita (97,5%) seguida de la ceftriaxona (2,5%). Estas observaciones fueron superiores a los hallazgos en los artículos de referencia [9–12]. En cuanto a que la cefalexina sea el antibiótico más prescrito en el estudio se puede deber a que ésta se encuentra indicada para infecciones del aparato respiratorio, infecciones de la piel y tejidos blandos, de los huesos y articulaciones y genitourinarias que frecuentemente se encuentran en el servicio de consulta externa, razón por la cual la prescriben la mayoría de los especialistas que conforman el servicio. Sin embargo, llama la atención de prescripciones de ceftriaxona, una cefalosporina de tercera generación de uso intrahospitalario.

Las fluoroquinolonas fueron el segundo grupo más prescrito con un 16,6% que corresponde a la ciprofloxacina (80%) y norfloxacina (20%). Al comparar estos resultados con otros estudios se encuentra que el porcentaje de fluoroquinolonas y especialmente la ciprofloxacina es más bajo que los encontrados en este trabajo. Esto puede ser debido a la presencia de mayor cantidad de pacientes con diagnósticos de infecciones del aparato genital masculino donde las fluoroquinolonas son la primera elección. También puede ser debido a la presencia de IVU complicadas que no son descritas en la historia clínica y cuyo tratamiento de primera elección es la ciprofloxacina. Finalmente se puede deber

a la promoción que realiza la industria farmacéutica de este grupo terapéutico, lo cual es una estrategia transnacional y no está dirigida a un solo país en particular [11, 16].

Tabla 2. Grupo de antibióticos prescritos en el servicio de consulta externa

Clasificación ATC	Grupo	Porcentaje de prescripción
J01C – D	Beta-Lactámicos	67,2%
J01M	Quinolonas–Fluoroquinolonas	16,5%
J01A	Tetraciclinas	6,0%
J01F	Macrólidos y Lincosamidas	4,3%
J01E	Sulfonamidas y Trimetoprim	2,7%
J01X	Otros	2,2%
J01G	Aminoglicósidos	0,8%
G01A	Furazolidona	0,3%

Tabla 3. Frecuencia de prescripción de antibióticos

Antibiótico	Porcentaje de prescripción
Amoxicilina	30%
Cefalexina	19%
Ciprofloxacina	13%
Dicloxacilina	13%
Doxiciclina	6%
Norfloxacina	3%
Penicilina Benzatínica	3%
Sulfametoxazol + Trimetoprim	3%
Nitrofurantoína	2%
Azitromicina	2%
Otros	6%

Las tetraciclinas constituyen el tercer grupo de antibióticos más prescritos con un 6% donde la doxiciclina ocupa el primer lugar (92%) seguida de la tetraciclina (8%). Estos resultados son concordantes con los estudios de referencia donde identifican la doxiciclina como la tetraciclina más prescrita [9–12]. En el estudio realizado en 5 EPS de Colombia, se reporta una frecuencia de uso de Doxiciclina del 4% [9] que en comparación con este trabajo es más alto. Este grupo se utilizó principalmente en diagnósticos de enfermedades genitourinarias, del sistema respiratorio y de la piel. El uso de tetraciclinas de manera ambulatoria debe ser cuidadoso pues además de la fototoxicidad que llega a causar quemaduras solares, también la ingesta de ciertos alimentos o medicamentos pueden afectar su eficacia, hecho que cobra importancia en pacientes ambulatorios que posiblemente no reciben información suficiente en estos aspectos [17, 18].

En el cuarto lugar se encuentran los macrólidos y las lincosamidas (4,3%) donde la azitromicina ocupa el primer lugar (58%), seguida de la claritromicina con el 26%, eritromicina con el 22% y la clindamicina con el 4%. En otro estudio los macrólidos tienen un porcentaje de prescripción más alto y la claritromicina es la más prescrita dentro de este grupo [11, 12]. La azitromicina presenta mayor utilización en diagnósticos infecciosos del sistema respiratorio, dadas sus indicaciones. La clindamicina es uno de los antibióticos eficaces en el tratamiento de las infecciones por anaerobios; está indicada, asociada con otros antibióticos, en las infecciones abdominales graves, en infecciones ginecológicas y en profilaxis quirúrgica gastrointestinal [19].

El siguiente grupo es el de sulfonamidas y trimetoprim (2,7%), representado por el trimetoprim-sulfametoxazol, el cual se utilizó predominantemente en infecciones genitourinarias y gastrointestinales.

Seguidamente se encuentran los antibióticos clasificados en el estudio como otros (2,2%), debido a que no pertenecen a un grupo farmacológico definido; en este grupo tenemos la nitrofurantoína que es el noveno antibiótico más prescrito. Su prescripción se debió principalmente a infecciones del tracto urinario no complicadas, ya que está recomendada como alternativa al trimetoprim-sulfametoxazol. En los estudios revisados no se hace mención de la nitrofurantoína ni del trimetoprim-sulfametoxazol.

Los grupos con menor frecuencia de prescripción fueron los aminoglicósidos (0,8%), representados por gentamicina (80%) y la amikacina (20%) y otros como la furazolidona (0,3%). Aunque la prescripción de los primeros fue baja, se debe tener en cuenta que estos antibióticos son de uso parenteral, tienen potencial toxicidad sobre el VIII par craneal y son de uso principalmente intrahospitalario.

Combinaciones de antibióticos prescritas

El 3% de las prescripciones contenían dos antibióticos en los cuales las combinaciones más usuales según el grupo al que pertenecen los antibióticos fueron: macrólido-penicilina (27,8%), quinolona-tetraciclina (22,2%), penicilina-penicilina (11,1%), tetraciclina-cefalosporinas (11,1%), otras combinaciones (27,8%). Las combinaciones según los antibióticos fueron claritromicina + amoxicilina (27,8%), ciprofloxacina + doxiciclina (22,2%), dicloxacilina + penicilina benzatínica (5,55%), penicilina procainica + penicilina benzatínica (5,55%), doxiciclina + ceftriaxona (11,1%) y otras combinaciones que se prescribieron una sol vez (27,8%).

De estas combinaciones se encontraron reportadas en la literatura las combinaciones de la claritromicina y la amoxicilina que se usan para tratar y prevenir la recaída de úlcera gástrica producida por *H. pylori*; nitrofurantoína y cefalexina para profilaxis de

infecciones urinarias recurrentes. En algunas guías, el manejo ambulatorio de mujeres con Enfermedad Pélvica Inflamatoria de intensidad leve, recomiendan ceftriaxona intramuscular en dosis única seguida de doxiciclina. Para las demás combinaciones se realizó una revisión bibliográfica sin encontrar documentado el uso de estas combinaciones, pero que sobre bases racionales podrían llegar a considerarse justificadas acorde a la condición clínica del paciente [20, 21].

Vía de administración y formas farmacéuticas

La vía de administración más utilizada fue la oral (95%), seguida de la intramuscular (4%). Por este motivo, las formas farmacéuticas más prescritas fueron las cápsulas (63,2%), las tabletas (31,9%), polvo para inyección (4%), solución inyectable (0,8%) y las suspensiones (0,2%). Estos resultados son los esperados para un servicio de consulta externa, ya que para los pacientes ambulatorios es mucho más cómoda la administración de medicamentos orales que los parenterales, lo que aumenta su aceptación y disminuye los efectos adversos (incluidas las complicaciones de las vías intravenosas). Además, la administración por vía oral genera al hospital menos costos, ya que es éste el que suministra directamente los medicamentos al paciente [22]. En general, las formas farmacéuticas utilizadas se ajustaron a este tipo de servicio.

Especialidad médica

Durante el periodo de estudio, medicina general prescribió el 70,1% de los antibióticos mientras que odontología lo hizo en un 10,4%. Las especialidades médicas que prescribieron antibióticos fueron ginecología y obstetricia (4,6%), endodoncia (3,8%), urología (2,6%), medicina interna (2,4%), maxilofacial (1,8%), ortopedia y traumatología (1%), y otras especialidades (3,3%).

Odontología, endodoncia y maxilofacial prescribieron en un 100% amoxicilina; en el servicio de ginecología y obstetricia y el de urología prescribieron los antibióticos para tratar enfermedades del sistema genitourinario: IVU, infecciones como la enfermedad inflamatoria pélvica o la endometritis posparto (cefalexina, nitrofurantoína, furazolidona, Gentamicina, ampicilina). Por las características del hospital era de esperarse que Medicina General fuera la especialidad que prescribió en mayor proporción los 21 antibióticos.

Interacciones

Un 29% de las prescripciones de antibióticos tiene documentada una interacción con el tratamiento concomitante. Por el alcance de este estudio, no es posible predecir cuál fue la consecuencia de esta potencial interacción. Sin embargo, es de resaltar que tanto

el paciente como al parecer el médico no conocen esta situación que puede desencadenar en un fallo terapéutico o en una reacción adversa al medicamento.

Características de la prescripción

La prescripción médica es un documento legal en la cual el clínico ordena preparar o proporcionar un tratamiento específico, por lo general una medicación, a un paciente en particular [2]. Los malos hábitos de prescripción son el origen de tratamientos inefectivos e inseguros, de exacerbación o alargamiento de la enfermedad, de tensión y daño al paciente y de costos más altos; de ahí que la prescripción tiene una gran importancia ya que es una garantía de que el tratamiento se pueda llevar a cabo sin inconvenientes [11]. La prescripción consta de tres partes fundamentales: información personal del paciente, información de quien prescribe e información del tratamiento.

Información personal del paciente. De las 613 prescripciones analizadas, el 100% tenían el número de historia clínica y el número de identificación, el género, la edad y la EPS.

Información del tratamiento. De las 8077 fórmulas, en 613 de ellas se encontraba prescrito al menos un antibiótico, como en algunos casos una fórmula podía contener más de un antibiótico, se encuentra entonces que en las 613 fórmulas estaban prescritos en total 631 ítems como antibióticos. El 100% se formuló con la denominación común internacional, la dosis, la forma farmacéutica, vía de administración y frecuencia. El 0,4% de los tratamientos no tenían de forma clara el tiempo de duración del tratamiento (1 unidad a despachar, 3 frascos a despachar).

La prevalencia de uso de antibióticos en el Servicio de Consulta Externa en el Hospital Engativá es baja, comparada con otros pocos estudios reportados en la literatura [9-12]. Los antibióticos que más se prescribieron durante el período de estudio fueron: Amoxicilina, Cefalexina, Ciprofloxacina, Dicloxacilina, Doxiciclina, esta última sin aparente información sobre el riesgo de quemaduras solares por exposición directa al sol o interacciones con alimentos y medicamentos. Se identificaron prescripciones sin diagnóstico infeccioso, asociación de antibióticos sin respaldo bibliográfico y potenciales interacciones con los medicamentos concomitantes.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a la Universidad Nacional de Colombia, al Servicio Farmacéutico y al personal administrativo de la Institución por la colaboración prestada en la realización de esta investigación.

REFERENCIAS

1. OMS, Promoción del uso racional de medicamentos: componentes centrales, perspectivas políticas de la OMS sobre medicamentos”, N. ° 5, septiembre de 2002.
2. OMS, “Estrategia mundial de la OMS para contener la resistencia a los antimicrobianos”, Centro de Recursos de Información Organización Mundial de la Salud, 1211 Ginebra 27, Suiza, 2001.
3. P. González, Vigilancia de la resistencia a antimicrobianos, *Rev. Chil. Infect.*, **19** (Supl. 2), S135 (2002).
4. C.M. Moreno, R.E. González, C. Beltrán, Mecanismos de resistencia antimicrobiana en patógenos respiratorios, *Rev. Otorrinolaringol. Cir. Cabeza Cuello*, **69**, 185 (2009).
5. D. Nicolau, Clinical and economic Implications of antimicrobial resistance for the management of community-acquired respiratory tract Infections, *J. Antimicrob. Chemother.*, **50** (Suppl S1), 61 (2002).
6. L.I. Barrero, J.S. Castillo, A.L. Leal, R. Sánchez, J.A. Cortés, C.A. Álvarez, A.L. González, Impacto económico de la resistencia a la meticilina en pacientes con bacteriemia por *Staphylococcus aureus* en hospitales de Bogotá, *Biomédica*, **34**, 345 (2014).
7. OMS, Resistencia a los antimicrobianos, nota descriptiva N. ° 194 de abril de 2015, URL: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs194/es/>, consultada en mayo de 2015.
8. G. Becerra, A. Plascencia, A. Luévanos, M. Domínguez, I. Hernández, Mecanismo de resistencia a antimicrobianos en bacterias, *Enf. Inf. Microbiol.*, **29**, 70 (2009).
9. J.J. López, M.M. Bejarano, E. Mora, Estudio de utilización de antibióticos en el servicio de consulta externa de un hospital de tercer nivel de la ciudad de Bogotá, *Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm.*, **37**, 224 (2008).
10. J.E. Machado, D.M. González, Dispensación de antibióticos de uso ambulatorio en una población colombiana, *Rev. Salud Pública*, **11**, 734 (2009).
11. F. Llanos, E. Silva, J. Velásquez, Prescripción de antibióticos en consulta externa pediátrica de un hospital de Lima, Perú, *Rev. Peruana Med. Exp. Salud Pública*, **20**, 28 (2004).

12. F. Llanos, E. Silva, J. Velásquez, Características de la prescripción antibiótica en los consultorios de medicina del Hospital Cayetano Heredia de Lima, Perú. *Rev. Peruana Med. Exp. Salud Pública*, **76**, 207 (2002).
13. A.R. Novoa, M. Rivera, Uso de antibióticos en pacientes hospitalizados y de consulta externa de pediatría del bloque materno infantil del hospital escuela, *Rev. Med. Post UNAH*, **7**, 268 (2002).
14. Dirección de Salud Pública, “Uso prudente de antibióticos en instituciones prestadoras de servicios de salud”, Secretaría Distrital de Salud de Bogotá, D.C., Editorial Linotipia Bolívar y Cía, Bogotá, 2008.
15. Ministerio de Salud y Protección Social, Guía de práctica clínica para pacientes con infecciones en los órganos genitales, URL: http://www.minsalud.gov.co/salud/Documents/observatorio_vih/documentos/atencion_integral/adultos/G.pacientes.ITS.VF.Mayo.2013.pdf, consultado en Diciembre de 2013.
16. W. Bajaña-Granja, C. Moncayo-Rojas, “La visita médica virtual como alternativa en la promoción de los productos farmacéuticos”, Tesis de Maestría, Universidad Católica de Santiago de Guayaquil, 2012, pp. 51-55.
17. Butlletígroç, Institut Català de Farmacologia, Fotosensibilidad por tetraciclinas, URL: <http://www.icf.uab.es/informacion/boletines/BG/bg32.90e.pdf> <http://www.icf.uab.es/informacion/boletines/BG/bg32.90e.pdf> , consultado en septiembre de 2013.
18. MedlinePlus, Tetraciclina, URL: <https://www.nlm.nih.gov/medlineplus/spanish/druginfo/meds/a682098-es.html>, consultado en septiembre de 2013.
19. MedlinePlus, Azitromicina, clindamicina, URL: <http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/spanish/druginfo/meds/a601067-es.html>, consultado en septiembre de 2013.
20. L.C. Jackson, L. Machado, Combinaciones de antimicrobianos, *Acta Medica*, **8**, 101 (1998).
21. G.M. Eliopoulos, C.T. Eliopoulos, Antibiotics combinations: Should they be tested? *Clin. Microbiol. Rev.*, **1**, 139 (1988).
22. OMS, “Guía de la Buena Prescripción”, Programa de acción sobre medicamentos esenciales, Ginebra, Suiza, 1998.

Diseño de un sistema bioadhesivo de clorhexidina empleando pullulan como matriz para uso en mucosa oral

Jean M. Castro Ruiz*, Bibiana M. Vallejo Díaz**, Helber J. Barbosa Barbosa***

Departamento de Farmacia, Universidad Nacional de Colombia, Sede Bogotá, Cra. 30 No. 45-03, Bogotá D.C., Colombia

* Correo electrónico: jemcastroru@unal.edu.co

** Correo electrónico: bmvallejod@unal.edu.co

***Correo electrónico: hdbarbosab@unal.edu.co

Recibido para evaluación: 11 de octubre de 2015.

Aceptado para publicación: 4 de febrero de 2016.

RESUMEN

Se desarrollaron sistemas poliméricos bioadhesivos del tipo película polimérica y comprimido empleando el biopolímero pullulan, para el transporte de digluconato de clorhexidina, el cual es un principio activo utilizado como alternativa terapéutica en el tratamiento de la gingivitis y de la enfermedad periodontal. Inicialmente, se evaluó la capacidad del polímero para formar películas y tabletas, luego, fueron propuestas formulaciones de cada uno de los sistemas. A las películas y comprimidos obtenidos se les determinaron propiedades mecánicas y de transporte, actividad anti-séptica, caracterización de las microestructuras obtenidas, además, se comprobó la liberación del fármaco desde los sistemas estudiados. Con las formulaciones seleccionadas se determinó su capacidad mucoadhesiva *in vitro*, empleando como sustrato mucosa oral porcina.

Palabras clave: películas poliméricas, tabletas bioadhesivas, mucoadhesión, pullulan.

SUMMARY

Design of a bioadhesive system with chlorhexidine using pullulan as matrix for use in oral mucous

As a therapeutic alternative in the transport of active substances in treatment of gingivitis and periodontal disease, bioadhesive polymeric systems type polymeric film and tablet were developed using the biopolymer pullulan. First, the ability of pullulan polymer to form films and tablets was evaluated and formulations were proposed for each system. Mechanical and transport properties, as well as antiseptic activity and microstructures characteristics were determined for these polymeric systems. Drug release behavior in the studied systems was also verified. The *in vitro* mucoadhesive capacity was determined with the formulations selected, using porcine oral mucous membrane like substrate.

Key words: Polymer films, Bioadhesive tablets, Mucoadhesion, Pullulan.

INTRODUCCIÓN

Los sistemas bioadhesivos han sido empleados especialmente en aplicaciones odontológicas, ortopédicas, oftálmicas y quirúrgicas y, actualmente, en el estudio sobre reemplazo de tejidos y la liberación controlada y localizada de principios activos sobre mucosas [1]. Las aplicaciones potenciales de este fenómeno exigen un estudio minucioso sobre los fundamentos que rigen el comportamiento de los materiales poliméricos empleados para estos desarrollos, cuando se encuentran en contacto con superficies de tipo biológico, y cómo, a partir del entendimiento de estos principios, es posible desarrollar materiales con mejores propiedades de desempeño y, a la par, proponer formulaciones optimizadas para utilizarlos como sistemas bioadhesivos [2]. El empleo de polímeros sintéticos es común en diversas aplicaciones industriales, sin embargo, la tendencia mundial es la utilización de materiales biodegradables como los polímeros naturales, gracias a sus propiedades y características biológicas, para el mejoramiento de los sistemas terapéuticos farmacéuticos. Los polisacáridos representan una clase importante de biomateriales naturales, que incluyen el almidón, la celulosa, la agarosa, el alginato, el dextrano y la quitina, entre otros [3]. Dentro de los materiales de tipo biopolímero disponibles para la formulación de productos, se encuentra el pullulan; un polisacárido natural soluble en agua, que se obtiene por la fermentación del almidón. Este material puede ser una alternativa como polímero objeto de estudio,

para ser utilizado en un sistema de transporte farmacéutico, formulado con un principio activo antiséptico, tal como la clorhexidina, que es ideal por ser un agente antimicrobiano de amplio espectro [4].

El pullulan es un polisacárido lineal neutro formado por enlaces α -(1 \rightarrow 6) glicosídicos vinculados a residuos de maltotriosa. Se trata de un exopolisacárido producido por el hongo *Aureobasidium pullulans*. La masa molecular de este biopolímero se encuentra en el rango de miles a dos millones de daltons, dependiendo de las condiciones de crecimiento del organismo *Aureobasidium pullulans*. Este polímero es biodegradable, no higroscópico; produce soluciones viscosas y transparentes, también, tiene una alta adherencia y capacidad de formar películas impermeables al oxígeno. Su estructura química se muestra en la figura 1. Las películas con pullulan han sido estudiadas, agregándoles principios activos de extractos de origen natural con propiedades antisépticas, antiinflamatorias, bactericida y antifúngicas, demostrando actividad antimicrobiana [5].

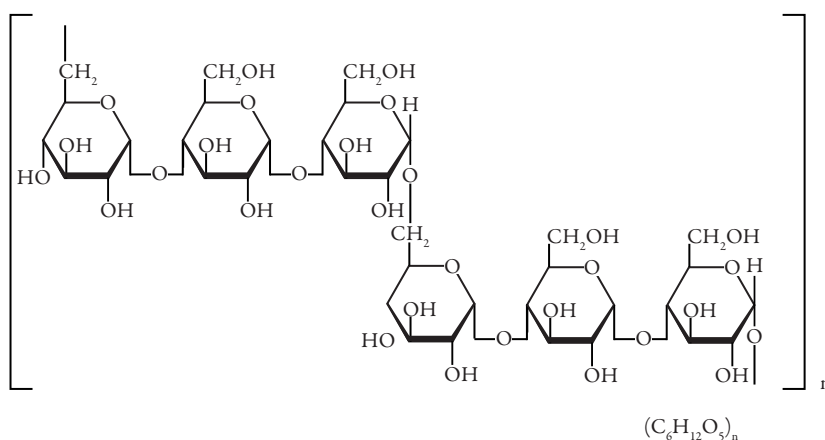


Figura 1. Estructura química del pullulan

La clorhexidina es uno de los antimicrobianos más utilizados en los tratamientos odontológicos por infecciones bucales [6]; esta biguanida presenta una gran actividad antibacteriana sumada a una alta substantividad [7]; tiene la capacidad de unirse a las proteínas tales como la albúmina presente en el suero o saliva, la película de la superficie dentaria, las glicoproteínas salivales y las membranas mucosas. Es un agente antimicrobiano de amplio espectro, activo contra bacterias Gram-positivas, Gram-negativas y levaduras. Debido a su naturaleza catiónica, la clorhexidina es capaz de unirse electrostáticamente a las superficies de las bacterias cargadas negativamente, dañando así la superficie externa de la pared celular y dejándola permeable.

Dependiendo de su concentración, esta biguanida puede tener efecto bacteriostático o bactericida [4], y ha sido utilizada en enjuagues bucales para el tratamiento de la gingivitis y de la enfermedad periodontal [8–9]. Las sales de clorhexidina pueden emplearse en la profilaxis y el tratamiento de las infecciones de boca como: la estomatitis, la estomatitis ulcerativa y la gingivitis aguda ulcerativa necrotizante, en concentraciones de 0,12% y 0,2% [5, 10–11].

Existe una variedad de sales de clorhexidina, donde se incluyen las formas acetato, gluconato, clorhidrato y digluconato, pero la forma digluconato (figura 2) es la más soluble en agua [12], a pH fisiológico se disocia fácilmente y es una sal muy estable, de allí que en los preparados farmacéuticos se use la sal digluconato [7].

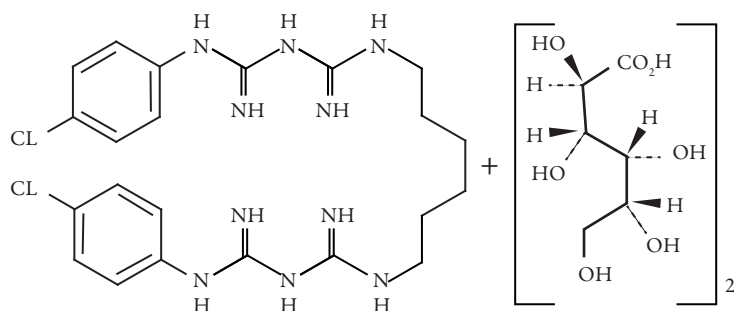


Figura 2. Estructura química de clorhexidina digluconato

En el mercado se encuentran tabletas para chupar con clorhexidina digluconato [13]. La clorhexidina se absorbe por las superficies orales, incluidos los dientes y luego se libera lentamente en forma activa [7]. En Colombia, la clorhexidina se encuentra comercializada en solución bucal al 0,12 y 0,2% y gel oral al 1%.

Partiendo de la premisa, de que la administración tópica será más efectiva, si permanece el principio activo en contacto con las áreas de la mucosa lesionada durante más tiempo, nos encontramos con que en la cavidad oral este aspecto es especialmente complejo por la intervención de factores como la secreción salival o los movimientos buco-linguales. Por ello, solo se pueda aumentar el tiempo de permanencia del fármaco en la boca de dos maneras: incrementando voluntariamente la retención del mismo por parte del paciente o incorporando a las formulaciones galénicas sustancias que favorezcan la adhesión a la mucosa.

Además, debido a la continua dilución salival del principio activo y la deglución involuntaria por parte del paciente, existe un alto riesgo de que se pierda la mayor parte del

medicamento. Este inconveniente se eliminaría o se podría reducir mediante el uso de sustancias adhesivas que facilitaran, aún sin colaboración por parte del paciente, la retención del sistema polimérico ayudando a mantener el fármaco en un contacto mayor con la mucosa oral. Por esta razón, en la presente investigación se busca el desarrollo de un sistema polimérico a base de pullulan cargado con clorhexidina, ya que su capacidad mucoadhesiva permite fijar el fármaco a la dentina, o superficie del diente, gracias a un mayor tiempo de contacto sobre la mucosa oral.

Los sistemas orales con propiedades mucoadhesivas representan matrices adecuadas para incorporar una gran variedad de fármacos, actualmente, estos sistemas son preferidos para el desarrollo de medicamentos de aplicación oral por sus ventajas, como los prolongados tiempos de residencia y la estabilidad de los fármacos [14].

MATERIALES Y MÉTODOS

Caracterización de tabletas y películas

En las tablas 1 y 2 presentan las formulaciones para comprimidos y películas.

Tabla 1. Composición de comprimidos

Formulación	Pullulan (%)	Celulosa microcristalina (%)	Aerosil 200 (%)	Estearato de magnesio (%)
TABFn1	79	20		1
TABFn2	78	20	1	1
TABFn3	99			1
TABFn4	98		1	1

Tabla 2. Composición de las películas poliméricas

Formulación	Pullulan (%)	Sorbitol (%)	Agar (%)	Glicerina (%)
Fn1	15	10		
Fn2	15	15	1	
Fn3	25	10		3
Fn4	25	15	1	3

Determinación de la densidad de las películas

La densidad se calculó a partir de la masa, determinada en una balanza digital con precisión de 0,01 g, y el volumen fue calculado a partir del área y el espesor de las películas.

En el cálculo del espesor se realizaron 6 determinaciones por película de cada una de las 3 películas, empleando un micrómetro Teclock, con una precisión de 0,01 mm.

Determinación morfológica de películas por microscopía electrónica de barrido (SEM)

La inspección morfológica de las películas se determinó en un microscopio electrónico de barrido FEI QUANTA 200. Las muestras se sometieron a un tratamiento previo de recubrimiento por metalización, realizado en un Sputter SDC-050 de la marca Balzers.

Evaluación de las propiedades de transporte

Hinchamiento de las tabletas

Las propiedades de hinchamiento y las características de erosión de los comprimidos se evaluaron determinando el porcentaje de hidratación y la erosión matricial. Cada comprimido se pesó w_1 (g) y sumergió en un fluido símil salival (2,38 g Na_2HPO_4 ; 0,19 g KH_2PO_4 y 8,00 g NaCl por litro de agua destilada ajustada con ácido fosfórico a pH 6,75). Se hicieron mediciones cada 5 min, los comprimidos se retiraron del medio para ser pesados w_2 (g), antes de pesarlos se les quitó el exceso de agua superficial. Los comprimidos hinchados fueron secados durante 24 h a 37 °C. Luego se colocaron en un desecador durante 48 h antes de ser pesados nuevamente w_3 (g). Los experimentos se realizaron por triplicado. El porcentaje de hidratación y la erosión matricial se calcularon de acuerdo a las ecuaciones 1 y 2 [15].

$$\%h = \frac{w_2 - w_1}{w_1} * 100 \quad (1)$$

$$EM = \frac{w_1 - w_3}{w_1} * 100 \quad (2)$$

Índice de hinchamiento de las películas

Se colocaron películas poliméricas de 20 x 20 mm de diámetro sobre mallas de acero, que previamente fueron pesadas, se sumergieron en agua y medio fisiológico; se realizaron mediciones cada 2 min y se calculó la cantidad de agua atrapada por la película. El grado de hinchamiento se calculó a partir de la ecuación 3 [16].

$$Q_{(t)} = \frac{w_t - w_0}{w_0} \quad (3)$$

Donde, $Q_{(t)}$ es el índice de hinchamiento, w_t es el peso (g) de la película al tiempo t (h), w_0 es el peso (g) de la película al tiempo cero.

Permeabilidad al vapor de agua de películas

La permeabilidad al vapor de agua se determinó utilizando un método estándar modificado del procedimiento ASTM designación E 96 M-05 [17]. Las muestras, previamente cortadas en círculos, se colocaron en cápsulas de vidrio conteniendo 2 g de silica gel. Se sellaron de manera hermética con las películas elaboradas y, posteriormente, fueron pesadas y luego introducidas en una cámara con humedad controlada. La prueba se llevó a cabo durante 12 horas, realizando mediciones cada hora. El valor de la permeabilidad al vapor de agua (TVA) es expresado en gramos de agua por unidad de tiempo por unidad de área [$g/(h.mm^2)$], el cual se calculó según la ecuación 4.

$$TVA = \frac{w - w_0}{t * A} \quad (4)$$

Donde TVA es transmisión de vapor de agua, w es el peso final (g), w_0 es el peso inicial (g), t es el tiempo (h), A es el área expuesta de la película (m^2) y (g/t) es la pendiente de la línea recta, gramos/horas.

Determinación de propiedades mecánicas

Dureza y friabilidad de las tabletas

Se realizó la prueba de dureza y friabilidad en 10 tabletas. Cada ensayo se hizo por triplicado, empleando un durómetro Sotax HT1 y un friabilizador Erweka TA3 (USP 36, 2013) para las pruebas de dureza y friabilidad respectivamente.

Resistencia a la ruptura por tensión de las películas

Se tomaron películas de 20 x 70 mm sujetas entre dos mordazas de extremo a extremo, para esta prueba se empleó un analizador de textura TA XT Plus, *Texture Analyser*, el ensayo se realizó por triplicado. Se realizó la determinación del módulo de elasticidad, denominado también de tracción o de Young.

Resistencia a la ruptura por perforación de las películas

Las películas fueron fijadas a una placa y perforadas por un probador que se mueve a una velocidad de 180 mm/min. Para esta prueba se empleó un analizador de Textura TA XT Plus, *Texture Analyser*, con una sonda cilíndrica de acero inoxidable, el ensayo se realizó por triplicado.

Ensayos de funcionalidad

Evaluación de la capacidad mucoadhesiva ex-vivo

Estos ensayos constituyen una forma indirecta de estudiar la adhesión de los sistemas poliméricos en la mucosa bucal. Para ello, ha sido utilizado el tejido bucal del cerdo, porque su morfología no queratinizada es bastante similar al epitelio bucal humano. Para llevar a cabo este ensayo se adaptó la metodología de Jiménez y colaboradores [18]. El tejido oral fue pegado en el fondo del vaso del equipo de disolución y los sistemas poliméricos se aplicaron sobre la mucosa oral porcina. Cada sistema polimérico, tanto tabletas como películas, fue humectado con 100 μ L de fluido salival y colocado sobre la mucosa, aplicando una fuerza digital durante 20 s. El ensayo fue realizado a una velocidad de agitación de 100 rpm utilizando 600 ml de fluido símil salival, pH 6,75 a 37° C. Se observó el comportamiento de los sistemas poliméricos hasta una completa disolución o desprendimiento de los mismos.

Incorporación del principio activo en los sistemas poliméricos

Preparación de las tabletas con clorhexidina digluconato

De acuerdo a los resultados obtenidos de la formulación con mejores propiedades mecánicas y de transporte, el principio activo se incorporó embebiendo la solución de clorhexidina digluconato en una premezcla de ingredientes sólidos. La mezcla se secó a una temperatura de 50° C hasta alcanzar un 2% de humedad, se mezcló con los demás ingredientes de la formulación y se comprimió utilizando las mismas condiciones antes descritas en obtención de las tabletas.

Preparación de las películas con clorhexidina digluconato

Fue preparada una dispersión polimérica a partir de la escogencia de la formulación con las mejores propiedades mecánicas y de transporte. Se pesó el agua y se adicionó, primero, el plastificante, agitando a 150 rpm hasta homogenizar, luego, el pullulan a temperatura de 50 °C por 20 min con agitación de 900 rpm, y por último, la clorhexidina digluconato, agitando continuamente con calentamiento por 10 min, luego se dejó enfriar y reposar la dispersión y se almacenó hasta su completa deaireación por 12 h. La dispersión obtenida fue vertida en una superficie acrílica con dimensiones de 15 x 15 cm; se secó a temperatura ambiente de 25 ± 2 °C por 36 h. Las películas formadas se desprendieron de los moldes y fueron almacenadas en condiciones controladas de humedad relativa de $55 \pm 2\%$ a 18 °C para las determinaciones posteriores. Las películas fueron cortadas con una dimensión de 2 cm², área que aportaría 5 mg de dosificación del principio activo, igual dosificación del principio activo en la tableta.

Metodología para evaluar la liberación de la clorhexidina digluconato desde los sistemas poliméricos

Adaptando la metodología de Chiappetta y colaboradores [15] para los estudios de liberación *in vitro* se empleó el método de la paleta (método II de la USP 36, 2013). Los sistemas poliméricos (comprimidos y películas) fueron introducidos en una canastilla y sumergidos en el fondo de los vasos. El ensayo se realizó empleando como medio de disolución 500 ml de fluido similar salival a una temperatura de $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$. La velocidad de agitación del ensayo fue de 50 rpm, los tiempos de muestreo fueron 15, 30, 60, 120 y 180 min. La determinación cuantitativa de clorhexidina fue realizada mediante espectrofotometría UV a una longitud de onda de 254 nm.

Con el fin de comparar los perfiles de disolución obtenidos a partir de los sistemas poliméricos evaluados en fluido similar salival, y para conocer el efecto de la composición de cada lote sobre la velocidad de liberación del fármaco, se utilizaron los índices propuestos por Moore y Flanner [19]. Este modelo independiente utiliza dos índices matemáticos para calcular los factores de diferencia f_1 (ecuación 5) y similitud f_2 (ecuación 6) entre los perfiles de disolución:

$$f_1 = \frac{\sum_{j=1}^n |R_j - T_j|}{\sum_{j=1}^n R_j} \times 100 \quad (5)$$

$$f_2 = 50 \times \log \left\{ \left[1 + \left(\frac{1}{n} \right) \sum_{j=1}^n w_j |R_j - T_j|^2 \right]^{-0.5} \right\} \times 100 \quad (6)$$

Donde n es el número de puntos temporales, R_j es el valor de disolución de la tanda de referencia en el tiempo t , y T_j es el valor de disolución de la tanda de prueba en el tiempo t .

Evaluación del efecto antimicrobiano de las películas y tabletas

Adaptando la metodología de Flamenco y Guevara [20] se realizaron medidas a través de un ensayo de inhibición de desarrollo bacteriano, colocando los sistemas poliméricos cargados con el fármaco objeto de estudio en contacto con tres cepas: *Escherichia coli* (ATCC 8739), *Pseudomona aeruginosa* (ATCC 9027) y *Candida albicans* (ATCC 10231).

Análisis estadístico de los datos

La interpretación estadística de los datos fue llevada a cabo mediante un análisis de varianza (ANOVA) y test HSD Tukey con un nivel de confianza del 95%. Se utilizó el *software* Statgraphics Centurión para Windows.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Evaluación preliminar de las formulaciones para la obtención de tabletas y películas

Teniendo en cuenta la codificación determinada para cada una de las formulaciones de las tabletas, a las formulaciones cargadas con el fármaco se le dará la terminación CLX. En la tabla 3 se reportan los valores del peso promedio final y dimensiones de cada una de las formulaciones de las tabletas para las cuatro formulaciones estudiadas. A los datos obtenidos se les realizó el análisis de varianza (ANOVA), con un nivel de confianza del 95%. Después del análisis estadístico se pudo evidenciar que entre los tratamientos de estudio se presentan diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) en el peso promedio final y dimensiones. De acuerdo con el análisis del test de Tukey se denota que la formulación TABFn2 tiene características diferentes a las demás formulaciones.

Tabla 3. Valores medios de los ensayos físicos de las diferentes formulaciones de las tabletas obtenidas

Formulación	Masa			Diámetro			Espesor		
	(mg) \pm SD			(mm) \pm SD			(mm) \pm SD		
TABFn1	100,57	\pm	0,55	6,48	\pm	0,01	2,65	\pm	0,01
TABFn2	101,64	\pm	0,16	6,43	\pm	0,01	2,66	\pm	0,01
TABFn3	101,39	\pm	0,39	6,46	\pm	0,01	2,60	\pm	0,01
TABFn4	101,24	\pm	0,35	6,49	\pm	0,04	2,65	\pm	0,01

De acuerdo a la codificación dada para cada una de las formulaciones de las películas, a las formulaciones cargadas con el fármaco también se le dará la terminación CLX como a las tabletas.

Se observaron las características físicas de las diferentes películas elaboradas, encontrando que las formulaciones Fn1 y Fn3 tuvieron buena apariencia, formaron películas transparentes y brillantes, lo que indica que es una ventaja en su aplicación sobre la superficie de la mucosa bucal (ver figura 3). No se percibió algún olor característico y presentaron buena flexibilidad. La película obtenida de la formulación Fn2 mostró rugosidad en su superficie y cierto grado de opacidad. Se le atribuyó esta característica a la adición del agar. Las películas obtenidas fueron segmentadas en cuadrados de 2 x 2 cm, en esta área se garantiza que las películas quedarán cargadas con 5 mg de principio activo, igual cantidad con la que se formularon las tabletas.

En la tabla 4 se reportan los valores del peso promedio final de cada una de las tres formulaciones elaboradas, así como el espesor y densidad de las mismas. A los datos obtenidos se les realizó el análisis de varianza (ANOVA), con un nivel de confianza del 95%. Después del análisis estadístico se evidenció que presentan diferencias estadística-

mente significativas ($p < 0,05$). El análisis del test de Tukey demuestra que la formulación Fn2 tiene características diferentes para todas las pruebas, demostrando la diferencia en la formulación respecto a Fn1 y Fn3. La formulación Fn2 mostró una diferencia en cuanto a sus valores medios de peso, espesor y densidad, esto se debe a la rugosidad de la película obtenida (provocada por la adición de agar).

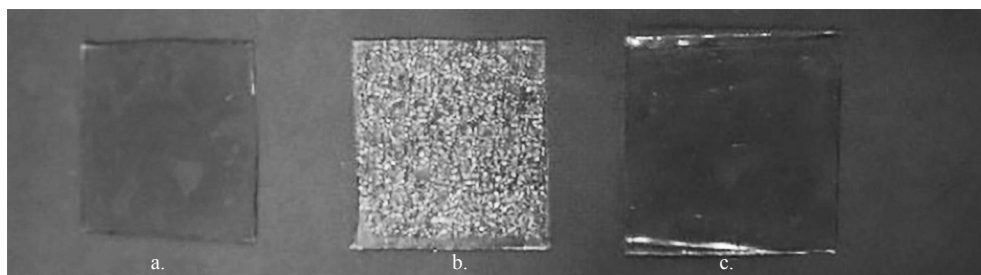


Figura 3. Fotos de las películas mucoadhesivas. a. Formulación Fn1, b. Formulación Fn2, c. Formulación Fn3

Tabla 4. Valores medios de los ensayos físicos de las diferentes formulaciones de las películas obtenidas

Formulación	Masa			Espesor			Densidad		
	(g) \pm SD			(mm) \pm SD			(g/cm ³) \pm SD		
Fn1	0,36	\pm	0,01	0,39	\pm	0,03	2,40	\pm	0,03
Fn2	0,48	\pm	0,01	0,54	\pm	0,01	2,22	\pm	0,02
Fn3	0,37	\pm	0,01	0,39	\pm	0,01	2,37	\pm	0,06

Las películas mucoadhesivas, de acuerdo con sus características de textura y diámetro, tendrían ventajas sobre las tabletas. Estas ventajas se asociarían al cumplimiento del tratamiento y preferencia por parte del paciente, al ser más cómodo de colocar y ser casi imperceptible al estar en contacto con las superficies de la boca, ya que, por el tipo de lesión presentada, la tableta pudiese causar algún tipo de molestia por carecer de flexibilidad.

Determinación morfológica de películas por microscopía electrónica de barrido (SEM)

Teniendo en cuenta el criterio de selección acogido para el ensayo de liberación, esta determinación se realizó únicamente sobre las películas blanco, obtenidas de la formulación Fn1 y de las películas cargadas obtenidas de la formulación Fn1CLX. Las cuatro micrografías de la figura 4 corresponden a observaciones hechas en corte transversal

y superficial de las películas sin principio activo y cargadas con este, en dos aumentos diferentes. Se observó una buena distribución de los polímeros, no se presentó separación de fases entre estos, y la película mostró una morfología suave, uniforme y sin la presencia de porosidades.

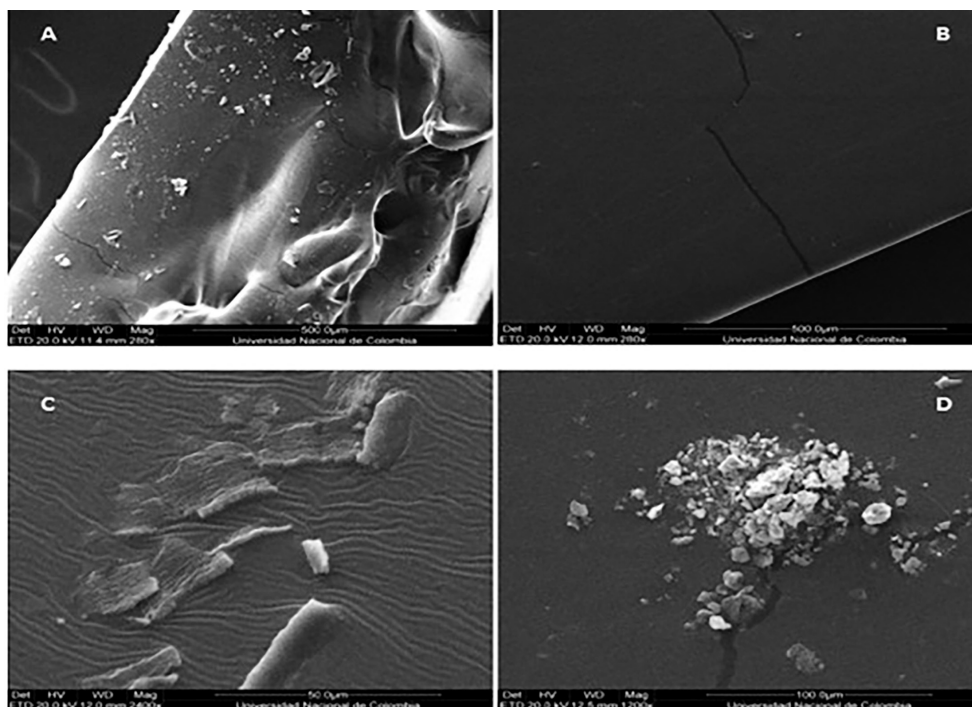


Figura 4. Micrografías de las películas. A y B corresponden a las películas blanco en corte transversal y superficial respectivamente; C y D son las películas con clorhexidina en corte transversal y superficial respectivamente.

Evaluación de propiedades de transporte de tabletas

Estudios de hinchamiento

Los perfiles de hidratación observados en la figura 5 fueron similares para las formulaciones TABFn2, TABFn3 y TABFn4 hasta los 10 min, luego se ve una diferencia entre estas, se observa que la formulación TABFn2 sigue hidratándose, mientras que las formulaciones TABFn3 y TABFn4 no retienen más agua. La formulación TABFn2 que contiene Aerosil 200 sigue captando agua debido a que este, por ser de naturaleza hidrofílica, tendría la capacidad de retener agua, por otro lado, su hinchamiento se ve

retrasado a diferencia de la formulación TABFn1 que contiene celulosa microcristalina pero no Aerosil 200. Así bien, para el caso de la formulación TABFn1, esta muestra un comportamiento diferente al resto de formulaciones por el alto contenido de celulosa microcristalina en el comprimido. Al representar una alta proporción en el sistema, la estructura interna de la matriz cambia, llegando a ser más porosa y menos restrictiva para que se difunda el agua hacía el interior del comprimido, produciendo de esta manera la relajación de las cadenas poliméricas con posterior hidratación del mismo y la continuación del proceso de erosión.

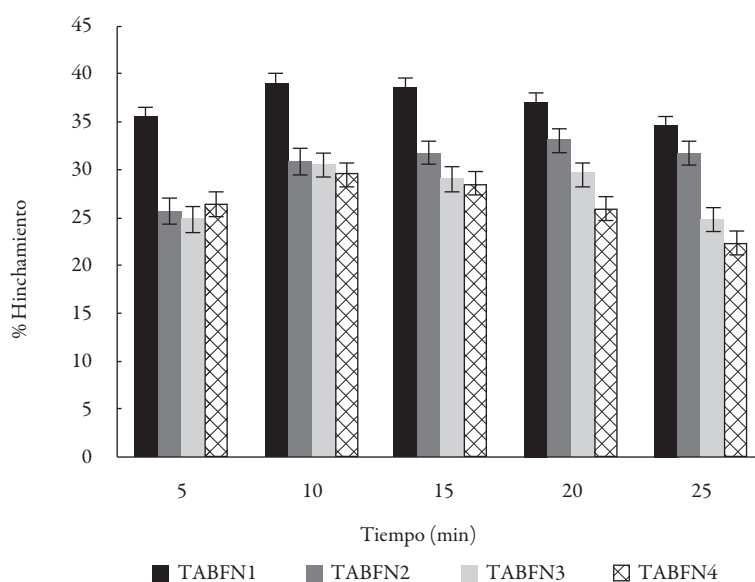


Figura 5. Porcentaje de hidratación de las tabletas en fluido símil salival. Cada valor representa la media de tres réplicas.

Con los resultados anteriores, de la hidratación de las tabletas, se evaluó el porcentaje de erosión producido por el desgaste de las mismas (figura 6). Se observó que la formulación TABFn2 no se erosiona tan fácilmente como las otras tres formulaciones. Esto se debe a la capacidad del Aerosil 200 de formar geles y de ejercer algún tipo de control sobre la viscosidad del preparado cuando entra en contacto con un medio acuoso. Es decir, se ve reflejado tanto en la hidratación como en la erosión el marcado efecto que ejerce el uso del Aerosil 200. En la prueba se observó que no hay hinchamiento exagerado de la tableta, este se manifiesta en los primeros 5 min de entrar en contacto con el medio acuoso, a los 10 min ya empieza a erosionarse, disminuyendo su diámetro considerablemente. De lo anterior se deduce que el uso de las tabletas y su aplicabilidad

en cualquier superficie de la mucosa bucal no ejercerían ningún tipo de inconveniente como resultado del hinchamiento. Por el contrario, puede ser una ventaja ya que, al relajarse las cadenas del polímero, el fármaco podría difundir desde sus redes de una manera controlada.

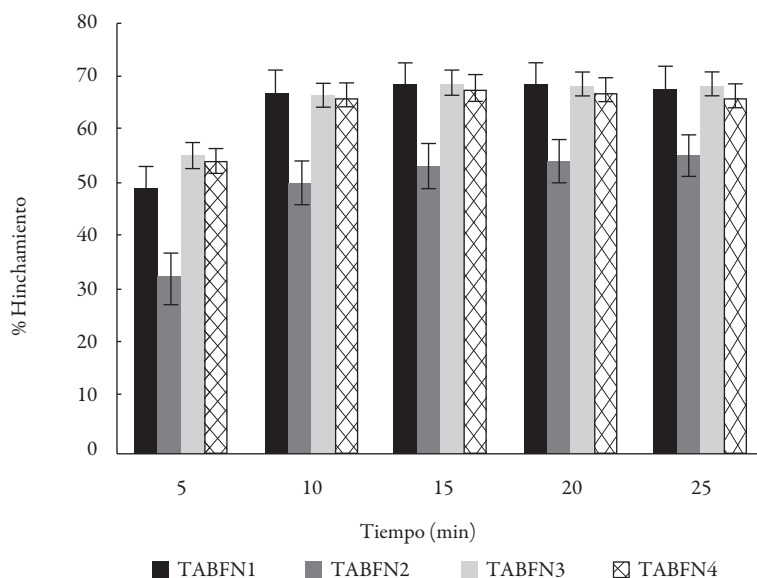


Figura 6. Erosión de las tabletas. Cada valor representa la media de tres réplicas

Evaluación de propiedades de transporte de películas

Estudios de hinchamiento

En la prueba de hinchamiento, la integridad de las películas de las tres formulaciones ensayadas se vio drásticamente afectada, ya que en un lapso de 2 min, las muestras sumergidas tanto en agua destilada y medio fisiológico pH 6,75 sufrieron un proceso de ablandamiento, tan rápido, que no fue posible realizar las mediciones y pesajes de las mismas, a la vez que se tornaron muy adhesivas.

Se puede decir que las películas compuestas con el biopolímero pullulan se adaptan rápidamente a cualquier superficie de la mucosa oral, lo que las hace funcionales para la entrega de fármacos en la cavidad bucal. El pullulan se puede combinar con diferentes polímeros que le confieran otras características de transporte, por ejemplo, con la gelatina o alginato [5]. Por lo tanto, se evidencia que la película experimenta un mayor cambio conformacional al relajar sus cadenas, favoreciendo así el paso del medio a través de esta.

Estudios de transmisión de vapor de agua de las películas

En la tabla 5 se presentan los resultados obtenidos para el ensayo de la transmisión de vapor de agua. El pullulan es de carácter hidrofílico, lo cual favorece esta propiedad de transporte. La inclusión del agar afecta un poco esta propiedad, debido, probablemente, a que las películas con agar tienen la particularidad de ser insolubles en agua en condiciones ambientales, al igual que el agar solo [21]. Se observó que la película preparada según la formulación Fn1 presenta una mayor transmisión de vapor de agua ($5,22 \text{ g/h}\cdot\text{m}^2$). La formulación Fn3 tuvo una TVA mayor a la formula Fn2, pero no muy lejana, esta última formulación es la que contiene el agar.

Tabla 5. Resultados en la determinación de la transmisión al vapor de agua

Tiempo (h)	Formulación								
	Fn1 ($\text{g/h}\cdot\text{m}^2$)			Fn2 ($\text{g/h}\cdot\text{m}^2$)			Fn3 ($\text{g/h}\cdot\text{m}^2$)		
1	5,23	±	0,66	5,01	±	0,98	4,77	±	0,81
2	5,14	±	0,63	4,39	±	0,76	4,67	±	0,66
3	4,82	±	0,54	4,21	±	0,61	4,50	±	0,65
4	4,80	±	0,88	4,35	±	0,39	4,44	±	0,76
5	4,43	±	1,29	4,67	±	0,38	4,35	±	0,44
6	4,54	±	1,05	4,32	±	0,36	4,13	±	0,41
7	4,12	±	0,70	4,38	±	0,06	4,07	±	0,45
8	4,21	±	0,41	4,56	±	0,08	4,06	±	0,32
9	4,07	±	0,44	4,63	±	0,52	4,21	±	0,46
10	3,86	±	0,29	4,58	±	0,46	4,06	±	0,35
11	3,90	±	0,29	4,53	±	0,17	4,08	±	0,52
12	4,14	±	0,25	4,40	±	0,35	4,02	±	0,45
TVA	5,22	±	0,58	4,54	±	0,42	4,71	±	0,49

De acuerdo con los resultados, se mantuvo un rango uniforme en la transmisión del vapor de agua en todas las preparaciones, pese a que la formulación Fn2 obtuvo la mayor ganancia de agua en función del tiempo, arrojó los menores resultados de transferencia al vapor de agua. Esto podría ser causado por la presencia del agar, el cual capta mucha agua en sus redes poliméricas, pero no deja pasar el vapor de agua de la misma manera que las películas fabricadas sólo con pullulan. Esto indicaría que una película de agar combinada con pullulan podría, eventualmente, retardar la liberación del fármaco desde un soporte polimérico. A los datos obtenidos se les realizó el análisis de varianza (ANOVA), con un nivel de confianza del 95%. Después del análisis estadístico se pudo

evidenciar que no se presentan diferencias estadísticamente significativas ($p>0,05$). El análisis del test de Tukey demuestra que todas las formulaciones tienen rasgos similares para estas pruebas.

Determinación de propiedades mecánicas

Pruebas de dureza y friabilidad de las tabletas

Las formulaciones preparadas solo con pullulan alcanzaron durezas más altas trabajadas bajo las mismas condiciones (ver tabla 6). Las tabletas mucoadhesivas no deberían ser muy duras ya que podría originar molestias al paciente y por consiguiente el incumplimiento del tratamiento, incluso la liberación del fármaco puede verse afectado. Tampoco deberían ser muy blandas, ya que al entrar en contacto con la humedad de la cavidad bucal podría ocurrir una desintegración muy rápida, donde el fármaco sea arrastrado por la saliva y los movimientos de la boca. Si la tableta no queda adherida el tiempo suficiente, el fármaco no alcanzaría a ser liberado en su totalidad. A los datos obtenidos se les realizó el análisis de varianza (ANOVA), con un nivel de confianza del 95%. El análisis estadístico evidenció que se presentan diferencias estadísticamente significativas ($p<0,05$). El análisis del test de Tukey demuestra que las formulaciones TABFn1 y TABFn2 tienen rasgos similares, estas tienen celulosa microcristalina en su formulación y estas a su vez fueron diferentes a las formulaciones TABFn3 y TABFn4 las cuales contienen solo pullulan en su composición.

Tabla 6. Valores medios de la dureza de las diferentes formulaciones de las tabletas obtenidas

Test	Dureza (Kp) \pm SD											
	TABFn1			TABFn2			TABFn3			TABFn4		
1	4,94	\pm	0,78	4,59	\pm	0,50	6,01	\pm	0,60	6,33	\pm	1,31
2	5,38	\pm	0,82	4,69	\pm	1,11	5,85	\pm	0,84	5,66	\pm	0,58
3	5,38	\pm	1,07	4,67	\pm	0,64	6,21	\pm	0,80	6,57	\pm	1,35
Promedio	5,23	\pm	0,81	4,65	\pm	0,16	6,02	\pm	0,18	6,19	\pm	0,47

En la tabla 7 se reportan los valores de friabilidad de cada una de las formulaciones de las tabletas obtenidas. Se encuentra que las formulaciones preparadas tienen valores muy bajos en esta prueba, y, se puede decir que tienen excelente friabilidad. Las tabletas que no presentaron buena friabilidad tendían a desgastarse con facilidad, un desgaste alto en los procesos de manufactura conllevaría a obtener tabletas porosas y de mal aspecto, además, en las pruebas de disolución generarían un efecto burst, el cual es la salida abrupta del fármaco de la forma farmacéutica. A los datos obtenidos se les realizó

el análisis de varianza (ANOVA), con un nivel de confianza del 95%. El análisis estadístico evidenció que no se presentan diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$). El análisis del test de Tukey demostró que todas las formulaciones tienen rasgos similares para esta prueba.

Tabla 7. Valores medios de la prueba de friabilidad de las diferentes formulaciones de las tabletas obtenidas

Test	Friabilidad (%) \pm SD											
	TABFn1			TABFn2			TABFn3			TABFn4		
1	0,07	\pm	0,01	0,06	\pm	0,01	0,02	\pm	0,01	0,04	\pm	0,01
2	0,04	\pm	0,01	0,08	\pm	0,02	0,02	\pm	0,01	0,02	\pm	0,01
3	0,05	\pm	0,02	0,01	\pm	0,00	0,03	\pm	0,01	0,02	\pm	0,01
Prom	0,05	\pm	0,02	0,05	\pm	0,04	0,02	\pm	0,01	0,03	\pm	0,01

Resistencia a la ruptura por tensión de películas

En estos ensayos, ninguna película sufrió ruptura por la tensión aplicada, únicamente elongación, y al finalizar la prueba retornaron a su longitud inicial; el comportamiento de estas películas es del tipo clásico de un material elástico o flexible que podría adaptarse al contorno de las superficies de la cavidad oral.

En la figura 7, se muestran la gráfica de tensión en función de la deformación de las películas evaluadas. La figura 8 demuestra el estiramiento de cada una de las películas cuando es halada desde los extremos, todas las películas tuvieron una elongación similar.

Los valores encontrados en el módulo de Young, de las formulaciones Fn1, Fn2 y Fn3 (tabla 8), muestran valores bajos de este, indicando que las películas no son rígidas, presentan una elevada elasticidad, por ello se deforman con facilidad y presentan gran capacidad de elongación y resistencia. Las fibras de elastina presentes en la dermis también tienen bajos los módulos de Young, con valores de 6×10^5 N/m², o bien, 0,6 N/mm² estirándose hasta un 250% de su longitud inicial.

Tabla 8. Módulos de Young de las películas poliméricas evaluadas

Película	Módulo de Young (N/mm ²) \pm SD
Fn1	0,76 \pm 0,07
Fn2	1,44 \pm 0,17
Fn3	0,83 \pm 0,11

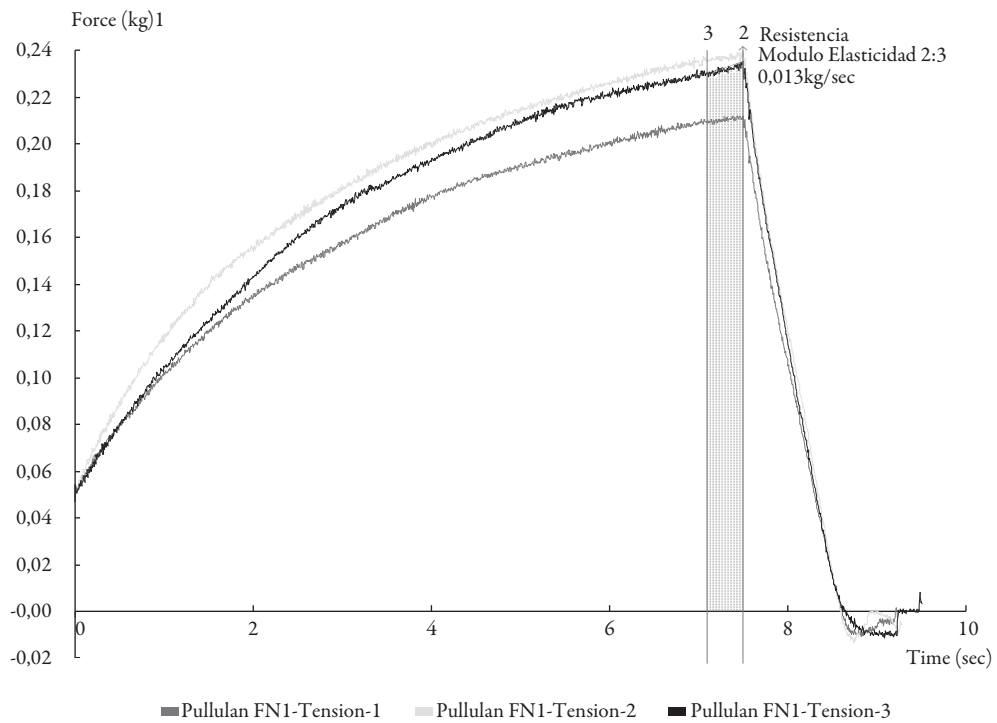


Figura 7. Gráficas de esfuerzo de las películas poliméricas evaluadas. Los valores representan la media de tres réplicas de la formulación Fn1

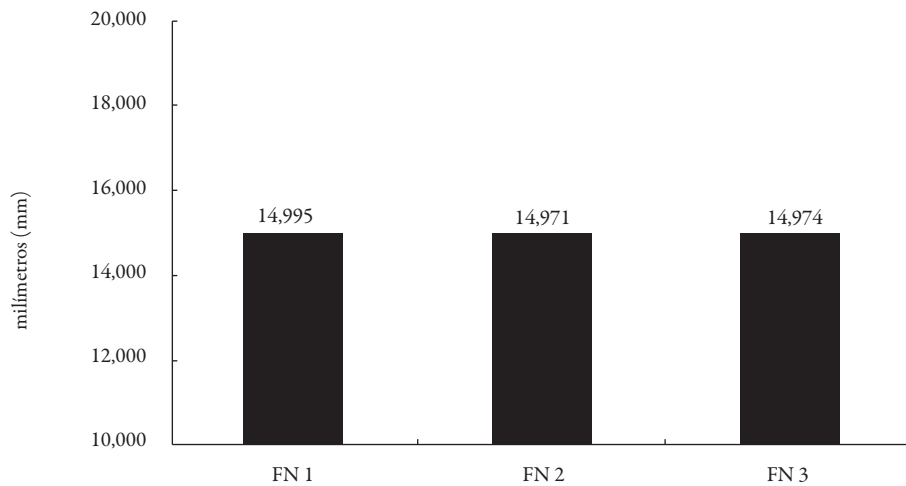


Figura 8. Esfuerzo-deformación de las películas poliméricas evaluadas. Cada valor representa la media de tres réplicas, las barras de error corresponden a la desviación estándar

De otro lado, el colágeno es muy flexible y se rompe cuando el esfuerzo de tensión es de aproximadamente 500 millones de Newtons por metro cuadrado, es decir, que su resistencia es similar a la del acero [22]. A los datos obtenidos se les realizó el análisis de varianza (ANOVA), con un nivel de confianza del 95%. Después del análisis estadístico evaneció que presentan diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$). El análisis del test de Tukey demuestra la rigidez de la formulación Fn2 ante las demás formulaciones.

Resistencia a la ruptura por perforación de películas

En la figura 9 se muestran la gráfica de perforación-deformación de las películas en las formulaciones evaluadas. Ninguna película fue perforada, pero en la resistencia al esfuerzo aplicado, se observó que la película polimérica formulada con agar (Fn2) tuvo un comportamiento más rígido al tratar de ser perforada en su superficie (ver tabla 9). Lo anterior, de acuerdo a las observaciones realizadas por Cerrada [23], podría atribuirse a numerosos factores estructurales, junto con la composición química, el peculiar comportamiento mecánico de los polímeros: su masa molecular, entrecruzamiento y ramificación, cristalinidad y morfología cristalina, copolimerización, plastificación, orientación molecular, cargas, mezclas, separación de fases y orientación en bloques.

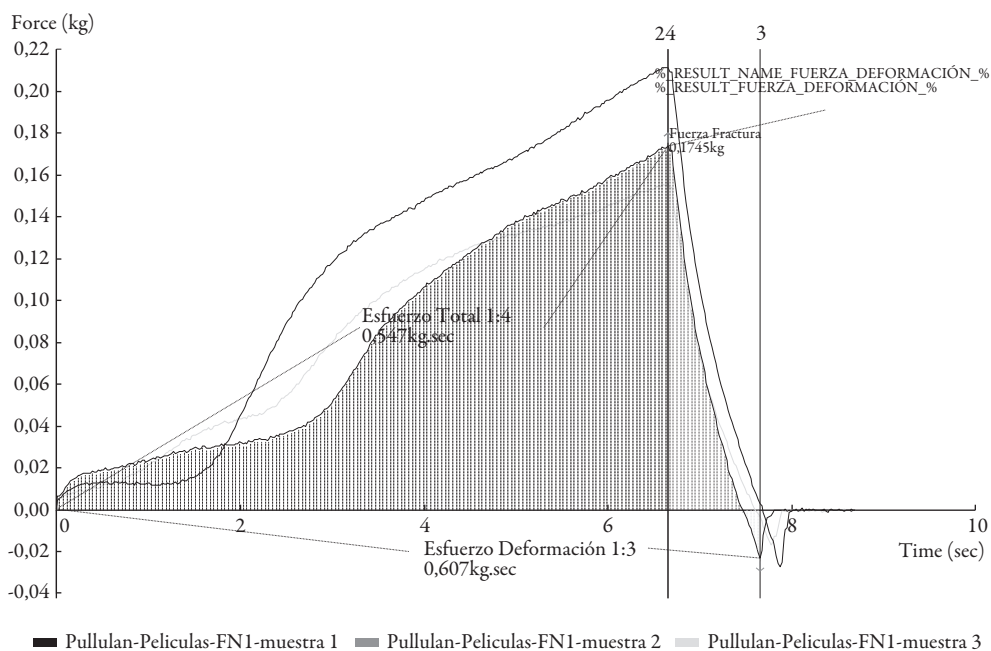


Figura 9. Gráfica de perforación de una de las películas poliméricas evaluadas. Los valores representan la media de tres réplicas de la formulación Fn1.

Tabla 9. Resultados del ensayo de resistencia a la ruptura por perforación de las películas

Películas	Elasticidad (mm)	Esfuerzo deformación (Kg.sec)
FN 1	19,91	0,683
FN 2	7,35	0,511
FN 3	19,97	1,290

Los polímeros lineales de masas moleculares altas y no iónicos forman películas fuertes, como es el caso del agar, las películas producidas por este polímero presentan una apariencia clara y, en general son fuertes, aunque son frágiles y poco flexibles [21]. Esto demostró el resultado de la película Fn2, la cual contiene agar, que tuvo una menor resistencia a la deformación, sin embargo, fue la que menos elasticidad presentó, confirmando así su rigidez. A los datos obtenidos se les realizó el análisis de varianza (ANOVA), con un nivel de confianza del 95%. Después del análisis estadístico se evidenció que presentan diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$). El análisis del test de Tukey demostró que la formulación Fn2 tiene rasgos distintos respecto a las demás formulaciones. Se desea, desde el desempeño funcional de productos, que la película no presente excesiva rigidez que dificulte su manipulación durante la colocación sobre la mucosa; los valores obtenidos muestran que la formulación Fn1 presenta el comportamiento mecánico esperado para la aplicación.

Evaluación de la capacidad mucoadhesiva *ex-vivo*

En el ensayo de mucoadhesión *ex vivo*, de las cuatro formulaciones ensayadas para las tabletas, las formulaciones que permanecieron adheridas a la mucosa oral hasta su completa erosión y dispersión fueron la TABFn2, TABFn3 y TABFn4, ninguna tableta se despegó de la mucosa oral hasta su completa erosión al final de la prueba (120 min). De la formulación TABFn1, una de las tabletas se desprendió a los 105 min, las restantes permanecieron adheridas a la mucosa oral hasta su completa erosión. Esta última formulación TABFn1 al igual que TABFn2 contenían celulosa microcristalina en su composición, sin embargo, la TABFn1 la contiene en un mayor porcentaje.

La celulosa microcristalina juega un papel fundamental en el complejo matricial, ya que logra mantener la estructura del comprimido casi intacta a través del tiempo, pero, de cierta forma, puede afectar un poco la capacidad bioadhesiva del comprimido. En el ensayo de mucoadhesión *ex-vivo* para el caso de las películas, las tres formulaciones resultantes, Fn1, Fn2 y Fn3, permanecieron adheridas hasta su completa erosión y dispersión, ninguna se despegó de la mucosa oral porcina. La alta adhesión del pullulan [24] permite que la película fabricada con este polímero quede adherida a la mucosa oral hasta su completa erosión. En la figura 10 se observa tanto la tableta como la película adheridas a la mucosa oral, demostrando que el tamaño de la tableta y la película son

apropiados para ser colocadas en la cavidad bucal de un adulto normal. En el caso de las películas se evidencia que, al adherirse a la superficie de la mucosa, estas se adaptan fácilmente y toman la forma del sitio de aplicación, para mayor comodidad del paciente, esto debido a que las películas son delgadas y flexibles, además, la estructura del polímero es fuertemente adhesiva a la mucosa y no se vería afectada por cambios mínimos en las actividades normales de los pacientes, por ejemplo, comer, beber o hablar [14].

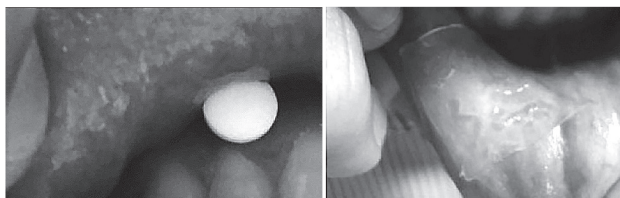


Figura 10. Imagen de la tableta y la película adherida a la mucosa oral

La tabla 10 presenta los resultados de mucoadhesión *ex-vivo* para los dos sistemas poliméricos estudiados.

Tabla 10. Resultados del ensayo de mucoadhesión *ex-vivo*

Tableta	Tiempo de prueba (120 min)	Película	Tiempo de prueba (120 min)
TABFN2	Ninguna se desprende	FN1	Ninguna se desprende
TABFN3	Ninguna se desprende	FN2	Ninguna se desprende
TABFN4	Ninguna se desprende	FN3	Ninguna se desprende

Incorporación del principio activo en los sistemas poliméricos

Con los resultados obtenidos en los diferentes ensayos llevados a cabo durante el presente estudio, y considerando las propiedades mecánicas, de transporte, así como el resultado de la prueba de mucoadhesión *ex-vivo*, se optó por evaluar el perfil de liberación del fármaco clorhexidina y su desempeño como antimicrobiano, a partir de la formulación para las películas Fn1 y para los comprimidos a partir de la formulación TABFn2.

La tabla 11 presenta los resultados de los análisis correspondientes a valores medios de los ensayos realizados a los sistemas poliméricos. La película cargada con el principio activo clorhexidina exhibió una apariencia similar a la de su blanco, de acuerdo a su transparencia y brillantez (ver figura 11).

Tabla 11. Valores medios de los ensayos físicos a partir de las formulaciones cargadas

Película	Formulación Fn1 (Blanco) \pm SD	Formulación Fn1CLX (Cargado) \pm SD
Masa (g)	$0,36 \pm 0,01$	$0,37 \pm 0,01$
Espesor (mm)	$0,39 \pm 0,03$	$0,40 \pm 0,01$
Densidad (g/cm^3)	$0,924 \pm 0,03$	$0,933 \pm 0,04$
Tableta	Formulación TABFn2 (Blanco) \pm SD	Formulación TABFn2CLX (Cargado) \pm SD
Masa (mg)	$101,64 \pm 0,16$	$100,95 \pm 0,02$
Diámetro (mm)	$6,43 \pm 0,01$	$6,45 \pm 0,02$
Espesor (mm)	$2,66 \pm 0,01$	$2,55 \pm 0,02$

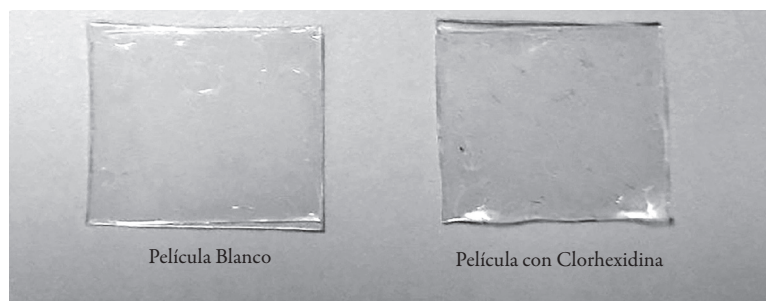


Figura 11. Imagen del sistema blanco y del sistema cargado para las películas

Se escogió una prueba determinante como es la mucoadhesión *ex-vivo* y se hicieron los ensayos a los sistemas cargados para películas y tabletas (Fn1CLX y TABFn2CLX) con el fin de evaluar la incidencia del fármaco en los preparados. Las muestras, correspondientes a tres réplicas de cada uno de los dos sistemas poliméricos, permanecieron adheridas a la mucosa oral porcina hasta su completa erosión y dispersión, conservando la propiedad de mucoadhesión.

Liberación de la clorhexidina desde las películas poliméricas y comprimidos a base de pullulan

Con los resultados obtenidos, se optó por evaluar el perfil de liberación a partir de la formulación para las películas Fn1 y de la formulación para los comprimidos TABFn2.

Al aplicar el modelo, independiente de los factores de similitud y diferencia a los perfiles obtenidos de las películas y los comprimidos (figura 12), se encontró que los datos de disolución de ambos perfiles son diferentes, arrojando resultados de similitud (f_2) de 41 (50-100) y de diferencia (f_1) de 20 (0-15). Sin embargo, la cesión de clorhexidina

digluconato a partir de los sistemas poliméricos llega a un 100% de fármaco disuelto. Este marcado efecto prolongado por parte del comprimido se debe a que este se erosionó más lento que la película. Esta se erosiona y dispersa a los pocos minutos, mientras la erosión de la tableta se observó a los 60 min, reteniendo el fármaco por más tiempo en sus redes poliméricas. A los 180 min, ambos perfiles demuestran el 100% de fármaco disuelto. El modelo matemático al cual se ajustan los perfiles de disolución de los dos sistemas poliméricos después de hacer los respectivos ajustes de los datos de liberación, es el de Korsmeyer y Peppas, el cual generalmente es lineal para valores de $M_t/M_\infty < 0,6$. Este modelo intenta explicar mecanismos de liberación de fármacos donde se presenta erosión o disolución de la matriz, y no es más que una forma generalizada de la ecuación de Higuchi como se expresa en la ecuación 7.

$$\frac{M_t}{M_\infty} = K \cdot t^n \quad (7)$$

Donde K es la constante de velocidad de liberación que incorpora características estructurales y geométricas del sistema de liberación y n es el exponente que indica el mecanismo mediante el cual ocurre la liberación. El valor del exponente n brinda información sobre la cinética de liberación del fármaco, por lo que, si n es igual a 0,5, la liberación del fármaco tiene lugar a través de un fenómeno de difusión de tipo fickiano, si n toma valores entre 0,5 y 1 indica que la liberación del fármaco es debida a un mecanismo de difusión no fickiano o anómalo, y, cuando n es igual a 1, el mecanismo de liberación del fármaco depende del proceso de relajación de las cadenas poliméricas [25].

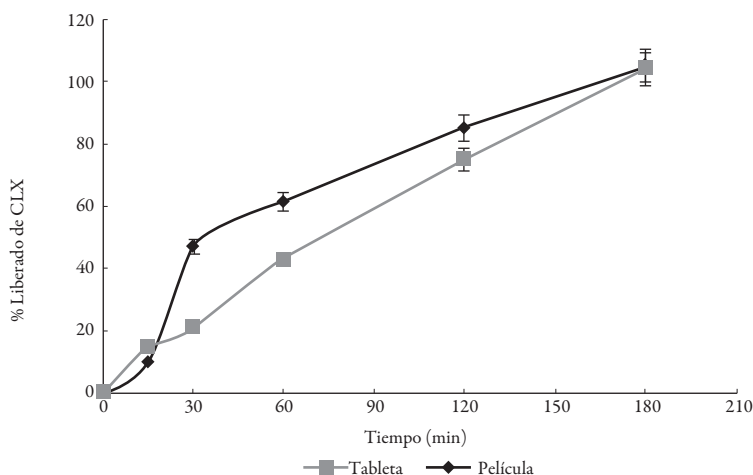


Figura 12. Perfil de liberación de los sistemas poliméricos evaluados. Cada valor representa la media de seis réplicas.

Teniendo en cuenta las consideraciones ya descritas y el modelo de Korsmeyer-Peppas, la velocidad de difusión del fármaco y la velocidad de relajación de las cadenas del polímero son del mismo orden de magnitud (ver tabla 12). En este caso, el proceso de difusión no fickiano se denomina anómalo, el cual puede ser interpretado como un proceso complejo, que no puede ser descrito como un modelo simple para predecir las observaciones experimentales [26].

Los datos experimentales fueron evaluados cinéticamente utilizando el programa computacional (KinetDS 3.0®).

Tabla 12. Resultados modelo matemático Korsmeyer-Peppas

Formulación	Modelo Korsmeyer-Peppas	
	n	(r^2)
TABFn2CLX	0,9858	0,9997
Fn1CLX	0,9926	0,9989

Evaluación del efecto antimicrobiano

Para la evaluación de la actividad antimicrobiana de los sistemas poliméricos cargados con el fármaco se calculó el promedio de la reducción logarítmica para los tres microorganismos de prueba y para tres tiempos de ensayo. En las tablas 13 y 14 se muestran los resultados de inhibición de desarrollo bacteriano para películas y tabletas. Luego de los 5 min de contacto, se observó en todos los ensayos efectuados que hay una considerable reducción del número de microorganismos sobrevivientes, y a los 10 min de contacto no se encontró ningún sobreviviente, indicando que la clorhexidina digluconato en ambos sistemas poliméricos es efectiva contra los microorganismos de prueba, y confirmando que hay liberación del principio activo desde estos sistemas de transporte diseñados.

Tabla 13. Resultados de inhibición de desarrollo bacteriano para películas

<i>E.coli</i> ATCC 8739						
	Caja 1	Caja 2	Caja 3	Promedio	Logaritmo	Diferencia
Control +	917×10^9	901×10^9	886×10^9	901×10^9	11,9547	-----
5 minutos	63×10^9	70×10^9	67×10^9	66×10^9	10,8195	1,1352
10 minutos	0	0	0	---	---	---
15 minutos	0	0	0	---	---	---

(Continúa)

Tabla 13. Resultados de inhibición de desarrollo bacteriano para películas (Continuación)

<i>Paeruginosa</i> ATCCC 9027						
	Caja 1	Caja 2	Caja 3	Promedio	Logaritmo	Diferencia
Control +	181 x 10 ⁹	174 x 10 ⁹	185 x 10 ⁹	180 x 10 ⁹	11,2553	-----
5 minutos	18 x 10 ⁹	11 x 10 ⁹	15 x 10 ⁹	14 x 10 ⁹	10,1461	1,1092
10 minutos	0	0	0	---	---	---
15 minutos	0	0	0	---	---	---
<i>C.albicans</i> ATCC 10231						
	Caja 1	Caja 2	Caja 3	Promedio	Logaritmo	Diferencia
Control +	321 x 10 ⁷	330 x 10 ⁷	319 x 10 ⁷	323 x 10 ⁷	9,5092	-----
5 minutos	55 x 10 ⁷	61 x 10 ⁷	64 x 10 ⁷	60 x 10 ⁷	8,7782	0,731
10 minutos	0	0	0	---	---	---
15 minutos	0	0	0	---	---	---

Tabla 14. Resultados de inhibición de desarrollo bacteriano para tabletas

<i>E.coli</i> ATCC 8739						
	Caja 1	Caja 2	Caja 3	Promedio	Logaritmo	Diferencia
Control +	917 x 10 ⁹	901 x 10 ⁹	886 x 10 ⁹	901 x 10 ⁹	11,9547	-----
5 minutos	63 x 10 ⁹	70 x 10 ⁹	67 x 10 ⁹	66 x 10 ⁹	10,8195	1,1352
10 minutos	0	0	0	---	---	---
15 minutos	0	0	0	---	---	---
<i>Paeruginosa</i> ATCCC 9027						
	Caja 1	Caja 2	Caja 3	Promedio	Logaritmo	Diferencia
Control +	181 x 10 ⁹	174 x 10 ⁹	185 x 10 ⁹	180 x 10 ⁹	11,2553	-----
5 minutos	18 x 10 ⁹	11 x 10 ⁹	15 x 10 ⁹	14 x 10 ⁹	10,1461	1,1092
10 minutos	0	0	0	---	---	---
15 minutos	0	0	0	---	---	---
<i>C.albicans</i> ATCC 10231						
	Caja 1	Caja 2	Caja 3	Promedio	Logaritmo	Diferencia
Control +	321 x 10 ⁷	330 x 10 ⁷	319 x 10 ⁷	323 x 10 ⁷	9,5092	-----
5 minutos	55 x 10 ⁷	61 x 10 ⁷	64 x 10 ⁷	60 x 10 ⁷	8,7782	0,731
10 minutos	0	0	0	---	---	---
15 minutos	0	0	0	---	---	---

CONCLUSIONES

A partir de esta investigación, queda demostrada la utilidad del pullulan (polímero biodegradable) como soporte polimérico versátil en la manufactura de dos tipos de preparados para su uso en la cavidad bucal. Los sistemas poliméricos estudiados, de acuerdo a las propiedades evaluadas, reúnen características que le confieren la posibilidad de incorporar el principio activo clorhexidina digluconato para preparados mucoadhesivos; se logró desarrollar películas poliméricas funcionales como un sistema alternativo de elección para transportar fármacos que sean fijados a la mucosa bucal, indistintamente que se dispersen en medio acuoso en pocos minutos, y tabletas mucoadhesivas que se convertirían en preparados alternativos para liberar fármacos de una manera gradual, propicias para aquellos fármacos que requieren fijarse en las superficies de la mucosa oral por un tiempo de residencia mayor.

Las películas de pullulan, sin estar en combinación con otros polímeros, tienen excelentes propiedades mecánicas y de transporte, lo cual permite que estas se fijen a cualquier superficie de la mucosa bucal y, además, facilitan el paso de los fluidos biológicos a través de sus cadenas poliméricas cediendo el fármaco de elección. Los estudios de liberación demostraron que ambos sistemas poliméricos entregan el principio activo en su totalidad, permitiendo prever su posible eficacia frente a las infecciones de la boca. Los sistemas poliméricos cargados con el principio activo clorhexidina digluconato, objeto de estudio en el presente trabajo, demuestran efectividad, inhibiendo el desarrollo de microorganismos como bacterias y levaduras.

AGRADECIMIENTOS

Por la colaboración prestada para el desarrollo de la tesis de Maestría de uno de los autores (J.M. Castro Ruiz, “Diseño de un sistema bioadhesivo de clorhexidina empleando pullulan como matriz para uso en mucosa oral”, Universidad Nacional de Colombia – Sede Bogotá, 2014) manifestamos nuestros agradecimientos al Departamento de Farmacia de la Universidad Nacional de Colombia, por facilitar los equipos e instalaciones requeridos para adelantar el presente estudio

REFERENCIAS

1. A.M. Hillery, A. Lloyd, J. Swarbrick, “Drug Delivery and Targeting”, Taylor and Francis, Inc., New York, 2001.

2. B. Vallejo, J. Perilla, Elementos conceptuales para estudiar el comportamiento bioadhesivo en polímeros, *Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm.* **37**(1), 34 (2008).
3. A. Dhanikula, R. Panchagnula, Development and characterization of biodegradable chitosan films for local delivery of paclitaxel, *AAPS J.*, **6**, 27 (2004).
4. B. Basrani, Update en Clorhexidina, *Canal Abierto: Revista de la Sociedad de Endodoncia de Chile*, **20**, 6 (2009).
5. A. Rodríguez, “Elaboración de biopelículas a base de quitosan y pululano adicionadas con extractos de cinco diferentes plantas y su evaluación en cultivos de microorganismos periodontopatógenos”, Tesis de Doctorado, Universidad Autónoma de Nuevo León, 2011, pp. 6.
6. I. Yévenes, J. Reyes, N. Campos, V. Saragoni, Efecto inhibitorio en placa microbiana y propiedades antibacterianas de enjuagatorios de clorhexidina, *Rev. Avances en Periodoncia e Implantología, Universidad de Chile*, **15**(1), 19 (2003).
7. M. Girón, “Determinación de la concentración, pH, estabilidad y el tiempo en el que permanece estable el principio activo de la clorhexidina preparada en las clínicas de cirugía de la facultad de odontología de la Universidad de San Carlos de Guatemala”, Tesis de Grado, Universidad de San Carlos de Guatemala, 2001, pp. 16-19.
8. J. Saavedra, M. Terrón, Antisépticos, Guía ABE. *Infecciones en Pediatría*, **1**, 2007.
9. R. Rowe, P. Sheskey, S. Owen, “Handbook of Pharmaceutical Excipients”, 5th ed, Pharmaceutical Press and American Pharmacists Association, Washington, 2006, pp. 163-166.
10. A. Martín, “Diseño y formulación de películas poliméricas como sistema de transporte de clorhexidina”, Tesis de Grado, Universidad Nacional de Colombia, 2009, p. 3.
11. J. Arévalo, J. Arribas, M. Hernández, M. Lizan, R. Herruzo, “Guía de utilización de antisépticos”, Sociedad Española de Medicina Preventiva, Salud Pública e Higiene, Madrid, 1998, p. 1-11.
12. F. Masquio, M. Correa, H. Nunes, Development and validation of a microbiological assay for determination of chlorhexidine digluconate in aqueous solution, *Braz. J. Pharm. Sci.*, **49**(2), 351 (2013).

13. Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios. URL: <http://www.aemps.gob.es/medicamentosUsoHumano/portada/home.htm>, julio de 2014.
14. J. Gajdziok, S. Holešová, J. Štembírek, E. Pazdziora, H. Landová, Petr Dolezel, D. Vetchý, Carmellose mucoadhesive oral films containing vermiculite/chlorhexidine nanocomposites as innovative biomaterials for treatment of oral infections, *BioMed Res. Int.*, **2015**(1), Article ID 580146 (2015).
15. D. Chiappetta, E. Gergic, M. Legaspi, G. Cantarelli, M. Garcia, C. Bregni, Comprimidos bioadhesivos formulados con excipientes hidrofílicos para uso bucofaríngeo, *Acta Farm. Bonaerense*, **25**(3), 360 (2006).
16. W. Li, N. Wu, Poly (vinyl alcohol) nanoparticles prepared by freezing-thawing process for protein/peptide drug delivery, *J. Control. Rel.*, **56**, 117 (1998).
17. N. Arévalo, M. Alemán, M. Rojas, R. Morales, Películas biodegradables a partir de residuos de cítricos: propuesta de empaques activos, *Rev. Latinoamer. Biotecnol. Amb. Algal.*, **1**(2), 124 (2010).
18. R. Jiménez, C. Mora, “Estudios de liberación *in-vitro* y permeación *ex-vivo* de microesferas de alginato-quitosano conteniendo benzocaína”, Tesis de Grado, Universidad del Atlántico, Barranquilla, 2013.
19. J. Moore, H. Flanner, Mathematical comparison of dissolution profiles, *Pharm. Tech.*, **20**, 64 (1996).
20. J. Flamenco, G. Guevara, “Formulación de tres productos desinfectantes y evaluación de su actividad antimicrobiana”, Tesis de Grado, Universidad de El Salvador, 2011, pp. 47.
21. A. López, “Diseño, desarrollo y aplicación de envases comestibles potencialmente bioactivos”, Tesis de Doctorado, Universidad Complutense de Madrid, 2013, pp. 11-13.
22. M. Gutiérrez, “Biomecánica: la física y la fisiología”, Instituto de Ciencia de Materiales, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Madrid, 2000.
23. M. Cerrada, “Propiedades mecánicas, comportamiento viscoelástico y anisotropía de copolímeros de alcohol vinílico y etileno”, Tesis de Doctorado, Universidad Complutense de Madrid, 1995, pp.57-59.
24. M. Rekha, C. Sharma, Pullulan as a promising biomaterial for biomedical applications: A perspective, *Trends Biomater. Artif. Organs*, **20**(2), 1 (2007).

25. J. Aragón, R. González, N. Brizuela, L. Oliver, Estudio cinético de liberación *in vitro* en un biomaterial compuesto por HAP-200/POVIAC/CaCO₃, *Rev. Iberoamer. Polím.*, **10**, 2 (2009).
26. C. Maderuelo, A. Zarzuelo, J.M.Lanao, Critical factors in the release hydrophilic matrices, *J. Control. Rel.*, **154**, 2 (2011).

Estudo matemático de estabilidade do desempenho do sistema $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ como mediador na eletrorredução de nitrito, com fins eletroanalíticos

Volodymyr V. Tkach^{1*}, André Santos², Reza Ojani³, Petró I. Yagodynets¹

¹ Universidade Nacional de Chernivtsi, 58012, Rua de Kotsyubyns'ky., 2, Chernivtsi, Ucrânia.
*Correio eletrônico: *nightwatcher2401@gmail.com*

² Universidade Federal de Uberlândia, Campus Pontal, 38304-402, Rua 20, 1600, Tupã, Ituiutaba, MG, Brasil

³ Universidade de Mazandarã, 47416-95447, 3º km. Rodovia de Forças Aéreas Iranianas, Babolsar, República Islâmica do Irã

Recibido para evaluación: 5 de mayo de 2015.

Aceptado para publicación: 5 de febrero de 2016.

RESUMO

O desempenho do sensor de nitrito, baseado no eletrodo, modificado pelo sistema de hexacianoferratos (II) e (III) como mediador, foi descrito matematicamente, sendo o modelo matemático correspondente analisado mediante a teoria de estabilidade lineal e análise de bifurcações. O modelo foi comparado com os análogos e com os sistemas experimentais

Palavras-chave: nitrito, eletrorredução, hexacianoferrato, sensores eletroquímicos, estado estacionário estável

SUMMARY

The mathematical stability study for the work of the $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ system as a mediator in nitrite electroreduction, used for electroanalytical means

The work of nitrite sensor, based on the electrode, modified by the system of hexacianoferrates (II) and (III) as mediator, was mathematically described, and the

corresponding mathematical model was analyzed by means of linear stability theory and bifurcation analysis. The model was compared with its analogues and experimental systems

Keywords: Nitrite, Electroreduction, Hexacyanoferrate, Electrochemical sensors, Stable steady-state.

INTRODUÇÃO

Os íons nitrito (NO_2^-) são muito comuns na natureza [1] e amplamente utilizados na conservação de alimentos, prevenindo a ação de microorganismos, como *Clostridium Botulinum* [2] e na síntese orgânica. Também podem ser utilizados como oxidante na síntese e eletrossíntese de polímeros condutores, como polipirrol [3] segundo:



em que Py é molécula de pirrol, sendo que o radical-cátion depois recombina, segundo o mecanismo de Díaz [4–6].

Por outro lado, estes íons são nocivos para a saúde humana [7]. O seu excesso pode causar câncer, haja vista a formação de N-nitrosocompostos [8, 9]. Outrossim, a sua alta concentração no sangue faz com que os íons reajam com o ferro (II) de hemoglobina formando metahemoglobina, que não tem capacidade de transportar oxigênio [10, 11]. Destarte, o desenvolvimento de sensores críveis e sensíveis para a detecção do nitrito tem recebido uma atenção contínua durante os últimos 10 anos.

Foram desenvolvidos vários métodos de determinação de nitrito, como espectrofotometria [12, 13], inclusive o oficialmente aceito no Brasil, baseado na reação de Griess, chemoluminescência [14], cromatografia [15, 16], eletroforese capilar [17] e métodos eletroquímicos [18–24]. Muitos dos procedimentos mencionados incluem fases lentas, requerem procedimentos adicionais, utilizam equipamento caro e impreciso, e assim os métodos eletroquímicos apresentam uma ótima alternativa.

No caso do nitrito, na questão do desenvolvimento de sensores eletroquímicos surge o problema de que a eletrorredução direta de íons nitrito requer a aplicação do grande sobrepotencial nas superfícies dos eletrodos planos. Uma boa maneira de reduzir o potencial é a modificação da superfície de eletrodos. Além disso, alguns

elétrodos modificados quimicamente foram usados para a catálise de eletrorredução de nitrito [25–28].

Já tem sido detectada a capacidade de ferrocianida [29], poli(*o*-toluidina) [30], heteropoliânios [31, 32], poli(*p*-acetanilida) [33] e íons complexos, como hexacianoferrato [34], de promover a eletrorredução de nitrito. Porém, os processos do desempenho de sensores, baseados em eletrodos, modificados por polímeros condutores [35–43], bem como os da eletropolimerização [44–51], podem acompanhar-se pelas instabilidades eletroquímicas (oscilatória e monotônica), que podem influenciar fortemente a resposta dos sensores. Reforçar-se-á, neste aspecto, o fato de o sistema de hexacianoferrato [52] ser um oscilador eletroquímico conhecido.

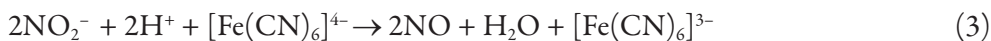
Anteriormente, tal comportamento só recebia interpretação fenomenológica, que, apesar de lógica, não tinha forte fundamento teórico, geralmente fornecido por um modelo matemático, capaz de descrever adequadamente o comportamento do sistema e por sua análise. Também é preciso mencionar que o modelo é capaz de descrever não só o sistema concreto, mas os que lhe são semelhantes, o que dará a possibilidade de comparação do comportamento.

O objetivo deste trabalho será desenvolver e analisar o modelo matemático do desempenho de sensor eletroquímico de nitrito, baseado em poliacetanilido, descrito em [34], pois a modelagem vai dar uma contribuição forte para a detecção do mecanismo do desempenho.

Nós já temos feito várias tentativas de descrever os sensores eletroquímicos de vários tipos de desempenho, baseados em polímeros condutores (PC) e outros compostos conjugados [53–64] (também foi feita a análise matemática da dependência do seu funcionamento do pH), ferroceno e derivados [65, 66], oxihidróxido de cobalto [67] e nanopartículas metálicas [68]. Mas em todos os casos foram os sensores, baseados em processos anódicos (por serem maioria). Agora vem descrito o modelo do sensor, baseado no processo catódico. Destarte, este trabalho segue como continuação da pesquisa, descrita nos trabalhos [34, 53–68] e deixa, por meio matemático, comparar o desempenho dos sensores catódico e anódico e a sua dependência do pH.

O SISTEMA E O SEU MODELO

O desempenho do sensor pode ser esquematicamente representado como:



Como se vê, apesar de o desempenho do mediador não depender do pH, como foi o caso do ferroceno [69, 70], os prótons participam do processo de redução, ou seja, o desempenho do sensor de nitrito depende do pH. Por isso, para a descrição matemática do funcionamento do sensor, introduzir-se-ão as 3 variáveis:

N – a concentração da substância que contém nitrito na camada pré-superficial;

θ – o grau do recobrimento do cátodo pelo hexacianoferrato (III);

h – a concentração de prótons na camada pré-superficial.

Para simplificar a modelagem, supõe-se que o líquido esteja agitando-se intensamente (para menosprezar o fluxo de convecção), que o eletrólito de suporte esteja em excesso (para menosprezar o fluxo de migração). A camada de difusão é suposta a ser de espessura constante, igual a δ o perfil concentracional nela é suposto a ser linear.

O analito (neste caso, o ácido nitroso) entra na camada pré-superficial por meio da difusão e sai dela por meio da reação da redução química. Posto assim, a equação de balanço será descrita como:

$$\frac{dN}{dt} = \frac{2}{\delta} \left(\frac{\Delta}{\delta} (N_i - N) - r_1 \right) \quad (5)$$

Sendo Δ o coeficiente de difusão, N_i a concentração do ácido nitroso no interior da solução, r_1 a velocidade da etapa química.

A forma oxidada do polímero condutor forma-se aquando da reação (1) e desaparece aquando da (2). Assim sendo, a equação de balanço dela será descrita como:

$$\frac{dN}{dt} = \frac{1}{\Gamma_{max}} (r_1 - r_2) \quad (6)$$

Sendo Γ_{max} a concentração máxima do polímero condutor oxidado, r_2 a velocidade da eletrorredução.

Os prótons entram na camada pré-superficial por meio da sua difusão e deixam-na aquando da eletrorredução (haja vista a equação (1)). Assim sendo (como eles não reagem com o ácido nitroso), a equação de balanço será descrita como:

$$\frac{dh}{dt} = \frac{2}{\delta} \left(\frac{D}{\delta} (h_i - h) - r_2 \right) \quad (7)$$

Sendo D o coeficiente de difusão de prótons, h_i a sua concentração no interior da solução.

As velocidades das reações química e eletroquímica podem descrever-se como:

$$r_1 = k_1 N^2 h^2 (1 - \theta), \quad r_2 = k_2 \theta \exp\left(-\frac{zF\varphi_0}{RT}\right) \quad (8 - 9)$$

Sendo z a quantidade de elétrons transferidos, $F = e^* N_A$, o número de Faraday, φ_0 o salto do potencial na dupla camada elétrica (DCE), relativo ao potencial de carga zero.

Comparado aos modelos, descritos em [53–64], o presente modelo é diferente. Como o processo é catódico, o signo da expressão dentro do expoente, é diferente. Outrossim, como os prótons tomam parte da etapa eletroquímica (e não se formam nela, como no caso do polímero condutor, modificado pelo fator pirrolopiridinoquinônico (PQQ)), a sua concentração é inclusa na expressão (8). Além disso, a ordem de reação dos prótons é igual a 2, disso surge a dependência quadrática da velocidade da reação eletroquímica da concentração de prótons.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O comportamento do sistema será descrito por meio da teoria de estabilidade linear. A matriz funcional de Jacobi, cujos elementos são calculados para o estado estacionário, pode ser descrita como:

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

Em que:

$$a_{11} = \frac{2}{\delta} \left(-\frac{\Delta}{\delta} - 2k_1 N h^2 (1 - \theta) \right);$$

$$a_{12} = \frac{2}{\delta} (k_1 h^2 N); \quad a_{13} = -\frac{4}{\delta} k_1 h N^2 (1 - \theta);$$

$$a_{21} = \frac{1}{\Gamma_{max}} (k_1 h^2 (1 - \theta));$$

$$a_{22} = \frac{1}{\Gamma_{max}} \left(-k_1 h^2 N - k_2 \exp\left(-\frac{zF\varphi_0}{RT}\right) - k_2 \theta \exp\left(-\frac{zF\varphi_0}{RT}\right) \alpha; \right.$$

$$\begin{aligned}
 a_{23} &= \frac{4}{\Gamma_{max}} k_1 h N^2 (1 - \theta); \\
 a_{31} &= \frac{2}{\delta} (-2k_1 N h^2 (1 - \theta)); \quad a_{32} = \frac{2}{\delta} ((k_1 h^2 N)); \\
 a_{33} &= \frac{2}{\delta} \left(-2k_2 N^2 \theta h \exp\left(-\frac{zF\varphi_0}{RT}\right) - \frac{D}{\delta} \right); \quad (11 - 19)
 \end{aligned}$$

Para simplificar a análise do jacobiano, vamos introduzir as novas variáveis de modo que o determinante da matriz se descreve como:

$$\frac{4}{\delta^2 \Gamma_{max}} \begin{vmatrix} -\kappa - \Omega & \Xi & -\Sigma \\ \Omega & -\Xi - E & \Sigma \\ -\Omega & \Xi & -\Sigma - \kappa_2 \end{vmatrix} \quad (20)$$

Usando o critério de Routh-Hurwitz e resolvendo a inequação $\text{Det } J < 0$, obter-se-á o requisito de estabilidade de estado estacionário como:

$$(-\kappa_1 - \Omega)(E\Sigma + \kappa_2\Xi + \kappa_2E) - \Omega(E\Sigma - \Xi\kappa_2) < 0 \quad (21)$$

A estabilidade do estado estacionário mantém-se pela rapidez da difusão do analito e a sua oxidação (altos valores de κ_1 e Ω . Outrossim, a positividade de E (única variável da equação (20), capaz de ter valores negativos), que descreve a ausência de quaisquer influências do processo de eletrorredução à dupla camada, junto aos altos valores de κ_2 (difusão rápida de prótons) e Σ (entrada deles na reação de eletrorredução) faz o estado estacionário mais estável e, em consequência, a resposta mais clara (a região de estabilidade de estado estacionário corresponde à região da dependência linear entre o parâmetro eletroquímico e concentração do analito).

Concluir-se-á também que, como o elemento positivo $\Omega\Xi\kappa_2$ desaparece, abrindo-se os parênteses, a zona topológica dos parâmetros do sistema, correspondente à estabilidade do estado estacionário vai ser muito vasta, o que confirma o excelente desempenho e sensibilidade do sensor, descrito em [34] e a linearidade da curva analítica na Fig. 7 do mencionado trabalho.

Ao contrário do observado para os sensores com eletro-oxidação, neste caso a diminuição do pH faz o estado estacionário mais estável. Isto vai ao encontro do observado em [34] e

em [33] para poliacetanilida. No trabalho [33], o desempenho do sensor foi testado em várias soluções-tampão com pH de 0 a 10 e a melhor resposta foi observada com o pH=0.

Com os valores negativos do pH, a resposta iria ser até melhor que a observada com o pH nulo, por causa da maior velocidade da eletrorredução e, assim, da formação de sítios ativos da eletrooxidação. No entanto, deve-se mencionar que o modelo pode mostrar que o efeito favorável do pH baixo ao desempenho do sensor não deve ser igual ao do efeito favorável do pH baixo no caso do polímero condutor. A Fig. 1 mostra que o estudo cronoamperométrico confirma a estabilidade do estado estacionário no sistema com o pH = 1:

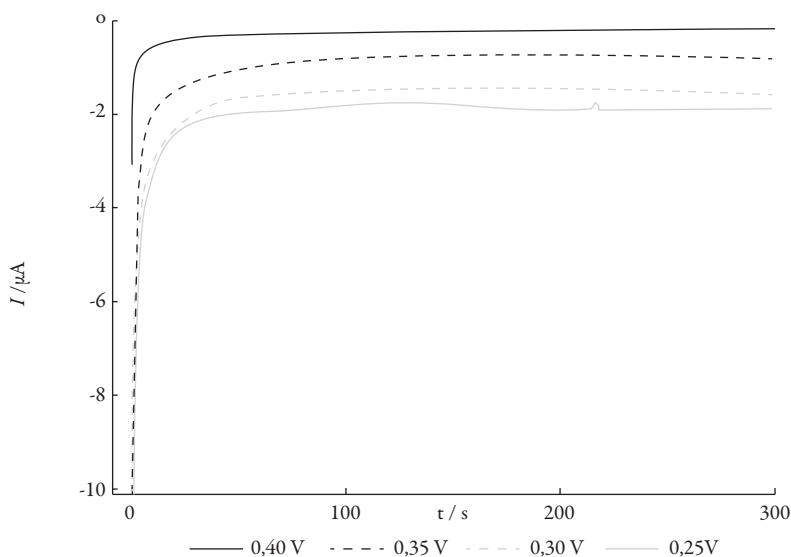


Figura 1. Cronoamperogramas registrados em tampão BR 0,04 mol L⁻¹, pH = 1,0 com um EPC na presença de 0,7 mmol L⁻¹ de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ e na ausência de nitrito. (amostragem: 1 ponto a cada 200 ms).

A igualdade de influências da eletrorredução à dupla camada às doutros processos (só com os valores negativos da E) pode causar a instabilidade monotônica, cuja condição para o caso é:

$$(-\kappa_1 - \Omega)(E\Sigma + \kappa_2\Xi + \kappa_2E) - \Omega(E\Sigma - \Xi\kappa_2) = 0 \quad (22)$$

Ela pode ser observada no trecho “N-formado” do voltamperograma, significando que nesta região a um valor da corrente elétrica são correspondentes os 3 valores de potencial, sendo que cada um corresponde a um estado estacionário instável.

Para a aparição do comportamento oscilatório, é necessário (mas não bastante) haver elementos positivos na diagonal principal da matriz funcional de Jacobi, responsáveis pela positiva “conexão de retorno”.

A única causa do comportamento oscilatório, na ausência de etapas autocatalíticas, podem ser a influência da eletrorredução à dupla camada, no caso da negatividade de α e do parâmetro E . Isto explica a aparição das tendências ao comportamento oscilatório de amplitude muito pequena, relatadas na curva cronoamperométrica de 0,25 V.

Posto que o valor preciso tenha outro signo, comparado ao dos casos, descritos em [53–64], a causa do comportamento oscilatório segue sendo a mesma.

As oscilações de pequena amplitude foram observadas no trabalho [33] e o modelo matemático mostra que para o caso de [34] tal comportamento também é possível.

Caso da reação de analito com prótons (descrição resumida das alterações no modelo). O modelo apresentado serve para descrever a detecção eletroquímica pH-independente dos analitos que reagem com os prótons ou não são as suas fontes (o exemplo apresentado o do sal de um ácido fraco). No caso de o analito reagir com os prótons, as equações (5) e (6) são alteradas haja vista a reação.

A forma da expressão, descrevendo a reação, depende da sua natureza. Com ela, a influência de prótons à estabilidade do estado estacionário não será uniforme, pois a reação deles com o analito vai apertar o estado estacionário à margem de estabilidade.

No caso de tal reação ser autocatalítica, ela será mais uma causa do comportamento oscilatório no sistema, como também foi observado nos modelos para os sensores de eletro-oxidação.

Caso da reação de analito, não dependente do pH (descrição resumida das alterações no modelo). No caso de o processo da detecção do analito não ser dependente do pH, a terceira variável exclui-se do sistema de equações diferenciais e este simplifica-se até as (5 – 6). A expressão da velocidade r_2 também vem sendo alterada.

O modelo analógico foi descrito matematicamente nos trabalhos anteriores para os sensores de eletro-oxidação [43–56], portanto a sua descrição vem sendo resumida.

CONCLUSÕES

1. O comportamento do sensor de eletrorredução de nitrito foi descrito matematicamente. Embora semelhante, tem divergências, comparado aos sensores de eletro-oxidação e aos de eletrorredução, na base dos polímeros condutores.

2. Ao contrário dos sensores de eletro-oxidação, a diminuição de pH favorece a estabilidade do estado estacionário. O único fator a não favorecer a estabilidade do estado estacionário podem ser as influências da eletrorredução à dupla camada elétrica e, caso haja, as reações entre os prótons e o analito. No entanto, a influência positiva do pH baixo para este caso e para o dos polímeros condutores é desigual.
3. Confirmou-se a presença de estruturas dissipativas temporais, os fatores de cujo manutenção são os mesmos que para os sistemas semelhantes. O comportamento oscilatório é causado pelos fatores eletroquímico e autocatalítico (se o houver).
4. As conclusões da modelagem vêm ao encontro das da pesquisa experimental e completam-nas.

REFERÊNCIAS

1. <http://www.inmoment.ru/beauty/health-body/nitrates.html> Acesso aos 7 de abril de 2015.
2. H. Yetim, A. Kayacier, Z. Kesmen, O. Sagdic, The effects of nitrite on the survival of *Clostridium sporogenes* and the autoxidation properties of the Kavurma, *Meat Sci.*, **72**, 206 (2006).
3. Y. Jung, N. Singh, K.-Sh. Choi, Cathodic Deposition of polypyrrole enabling the one-step assembly of metal-polymer hybrid electrodes, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **48**, 8331 (2009).
4. S. Sadki, P. Schottland, N. Brodie, G. Saboraud, The mechanisms of pyrrole electropolymerization, *Chem. Soc. Rev.*, **29**, 283 (2009).
5. N. Alizadeh, M. Babaei, S. Nabavi, Gas sensing ability of a nanostructured conducting polypyrrole film prepared by catalytic electropolymerization on Cu/Au interdigital electrodes, *Electroanal.*, **25**, 2181 (2013).
6. M. Gholami, A-M. Ghasemi, M.M. Loghavi *et al.*, Preparation of a miniaturised iodide ion selective sensor using polypyrrole and pencil lead: effect of double coating, electropolymerisation time, and current density, *Chem. Papers*, **67**, 1079 (2013).
7. I.A. Wolff, A.E. Wasserman, Nitrates, nitrites and nitrosamines, *Science*, **177**, 15 (1972).
8. C. Yang, Q. Lu, S. Hu, A novel nitrite amperometric sensor and its application in food analysis, *Electroan.*, **18**, 2188 (2006).

9. M.J. Moorcroft, J. Davis, R.G. Compton, Detection and determination of nitrate and nitrite: A review, *Talanta*, **54**, 785 (2001).
10. E. Morcos, N.P. Wiklund, Nitrite and nitrate measurement in human urine by capillary electrophoresis, *Electrophoresis*, **22**, 2763 (2001).
11. V.Y. Titov, Y.M. Petrenko, Proposed mechanism of nitrite-induced methemoglobinemia, *Biochemistry*, **70**, 473 (2005).
12. M. Bru, M.I. Burguete, F. Galindo *et al.*, Cross-linked poly(2-hydroxyethyl-methacrylate) films doped with 1,2-diaminoanthraquinone (DAQ) as efficient materials for the colorimetric sensing of nitric oxide and nitrite anion, *Tetrahedron Lett.*, **47**, 1787 (2006).
13. Brasil, Ministério da agricultura, Pecuária e Abastecimento, Portaria nº 59 de 19 de março de 2009, Disponível em: < <http://www.tuvsud.com.br/uploads/images/1401819075227662290092/ministerio-da-agricultura-fisico-quimicaanimal-e-agua-escopo.pdf> >, acesso em outubro, 2014.
14. P. Mikusuka, Z. Vecera, Flow-injection chemiluminescence determination of low concentrations of nitrite in water, *Anal. Chim. Acta*, **495**, 225 (2003).
15. I.M.P.L.V.O. Ferreira, S. Silva, Quantification of residual nitrite and nitrate in ham by reverse-phase high performance liquid chromatography/diode array detector, *Talanta*, **74**, 1598 (2008).
16. M.I.H. Helaleh, T. Korenaga, Ion chromatographic method for simultaneous determination of nitrate and nitrite in human saliva, *J. Chromatogr. B*, **744**, 433 (2000).
17. E. Szoko, T. Tabi, A.S. Halasz *et al.*, High sensitivity analysis of nitrite and nitrate in biological samples by capillary zone electrophoresis with transient isotachophoretic sample stacking, *J. Chromatogr. A*, **1051**, 177 (2004).
18. X. Cai, Z. Zhao, Determination of trace nitrite by catalytic polarography in ferrous iron thiocyanate medium, *J. Electroanal. Chem.*, **252**, 361 (1988).
19. J.E. Newbry, M.P.L. Haddad, Amperometric determination of nitrite by oxidation at a glassy carbon electrode, *Analyst*, **110**, 8 (1985).
20. M. Trojanowicz, W. Matuszewski, B. Szostek, Simultaneous determination of nitrite and nitrate in water using flow-injection biamperometry, *Anal. Chim. Acta*, **261**, 391 (1992).

21. Z.H. Wen, T.F. Kang, Determination of nitrite using sensors based on nickel phthalocyanine polymer modified electrodes, *Talanta*, **62**, 351 (2004).
22. M. Thamae, T. Nyokong, Cobalt(II) porphyrine catalysed reduction of nitrite, *J. Electroanal. Chem.*, **470**, 126 (1999).
23. J. Obirai, T. Nyokong, J. Obirai, T. Nyokong, Electrochemical and catalytic properties of chromium tetraaminophthalocyanine, *Electroanal. Chem.*, **573**, 77 (2004).
24. J. Davis, M.J. Moorcroft, S.J. Wilkins *et al.*, Electrochemical detection of nitrate and nitrite at a copper modified electrode, *Analyst*, **125**, 737 (2000).
25. L. Ruhlmann, G. Genet, Wells–Dawson-derived tetrameric complexes $\{\text{K}_{28}\text{H}_8[\text{P}_2\text{W}_{15}\text{Ti}_3\text{O}_{60.5}]_4\}$ electrochemical behaviour and electrocatalytic reduction of nitrite and of nitric oxide, *J. Electroanal. Chem.*, **568**, 315 (2004).
26. B. Keita, I. M. Mbomekalle, L. Nadjo, R. Contant, A novel Dawson heteropolyanion and two of its sandwich-type derivatives $[\text{Zn}_4(\text{H}_2\text{O})_2(\text{H}_4\text{AsW}_{15}\text{O}_{56})_2]^{18-}$, $[\text{Cu}_4(\text{H}_2\text{O})_2(\text{H}_4\text{AsW}_{15}\text{O}_{56})_2]^{18-}$: Cyclic voltammetry and electrocatalytic properties towards nitrite and nitrate, *Electrochem. Comm.*, **3**, 267 (2001).
27. I. Chad, B. Mekki, B. Emek *et al.*, Electrocatalytic reductions of nitrite, nitric oxide, and nitrous oxide by thermophilic cytochrome P450 CYP119 in film-modified electrodes and an analytical comparison of its catalytic activities with myoglobin, *J. Am. Chem. Soc.*, **126**, 4934 (2004).
28. L. Liu L. Tian, H. Xu, N. Lu, Electrochemical properties of organo-titanium substituted heteropolytungstate and its electrocatalytic reduction of nitrite, *J. Electroanal. Chem.*, **587**, 213 (2006).
29. R. Ojani, J.B. Raoof, E. Zarei, Electrocatalytic reduction of nitrite using ferricyanide: Application for its simple and selective determination, *Electrochim. Acta*, **52**, 753 (2006).
30. R. Ojani, J.B. Raoof, E. Zarei, Poly(ortho-toluidine) modified carbon paste electrode: A sensor for electrocatalytic reduction of nitrite, *Electroanal.*, **20**, 79 (2008).
31. R. Ojani, M.A. Rahmanifar, P. Naderi, Electrocatalytic reduction of nitrite by phosphotungstic heteropolyanion. Application for its simple and selective determination, *Electroanal.*, **20**, 1092 (2008).

32. J.B. Raoof, R. Ojani, M. Ramine, Voltammetric sensor for nitrite determination based on its electrocatalytic reduction at the surface of p- duroquinone modified carbon paste electrode, *J. Solid. State Electrochem.*, **13**, 1311 (2009).
33. R. Ojani, J.B. Raoof, V. Rahemi, A simple and efficient electrochemical sensor for electrocatalytic reduction of nitrite, based on poly(4-aminoacetanilide), *J. Chin. Chem. Soc.*, **58**, 247 (2011).
34. L.A.P. Filho, R.M. Takeuchi, M.A.G. Trindade, A.L. Santos, Determinação voltamétrica de nitrito empregando o íon $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ como mediador eletroquímico, *Orbital Elec. J. Chem.*, **7**, 10 (2015).
35. Y. Ohnuki, T. Ohsaka, H. Matsuda, N.J. Oyama, Permselectivity of films, prepared by electrochemical oxidation of phenol and amino-aromatic compounds, *Electroanal. Chem.*, **158**, 55 (1983).
36. A. Volkov, G. Tourillon, P.C. Lacaze, J.E. Dubois, Electrochemical polymerization of aromatic amines. IR, XPS and PMT study of thin film formation at Pt electrode, *J. Electroanal. Chem.*, **115**, 279 (1980).
37. V.M. de Andrade, "Confecção de biossensores através da imobilização de bio-componentes por eletropolimerização de pirrol", Tés. M. Eng. UFRGS, Porto Alegre, 2006.
38. J.P. Tosar-Rovira, "Estudio de la inmovilización de oligonucleótidos a electrodos modificados de oro: polipirrol, y detección electroquímica de secuencias complementarias", Tés. Lic. Bioquím., Universidad de la República, Montevideo, 2008.
39. A. Ramanavicius, A. Ramanaviciene, A. Malinauskas, Electrochemical sensors, based on conducting polymer polypyrrole, *Electrochim. Acta*, **51**, 6025 (2006).
40. R. Singh, Prospects of organic conducting polymer modified electrodes: Enzymosensors, *Int. J. Electrochem.*, ID 502707 (2012).
41. D. Zane, G.B. Appetecchi, C. Bianchini *et al.*, An impedimetric glucose biosensor on overoxidized polypyrrole thin film, *Electroanal.*, **23**, 1134 (2011).
42. T. McQuade, A. Pullen, T.M. Swager, Conjugated polymer based chemical sensors, *Chem. Rev.*, **100**, 2537 (2000).
43. R. Ojani, J.B. Raoof, A. Ahmady, S.R. Hosseini, High improved methanol oxidation onto carbon paste electrode modified by nickel particles dispersed into poly(2,5-dimethylamine) film, *Casp. J. Chem.*, **2**, 45 (2013).

44. A.S. Liu, M.A.S. Oliveira, Electrodeposition of polypyrrole films on aluminium from tartrate aqueous solution, *J. Braz. Chem. Soc.*, **18**, 143 (2007).
45. D. Sazou, The dynamic behavior of the electrochemical polymerization of indole in acetonitrile – water mixtures, *Synth. Met.*, **130**, 45 (2002).
46. 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).
47. M. Bazzouai, E.A. Bazzouai, 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).
48. 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).
49. K. Aoki, I. Mukoyama, J. Chen, Competition between polymerization and dissolution of poly(3-methylthiophene) films, *Russ. J. Electrochem.*, **3**, 319 (2004).
50. I. Das, N.R. Agrawal, S.A. Ansari, S.K. Gupta, Pattern formation and oscillatory polymerization of thiophene, *Ind. J. Chem.*, **47A**, 1798 (2008).
51. M.S. Ba-Shammakh, "Electropolymerization of pyrrole on mild steel for corrosion protection", Ph.D. Thes., King Fahd University of Petroleum and Minerals, Dharan, Saudi Arabia, 2002.
52. A. Olexova, M. Milichercik, L. Treindl, Oscillatory oxidation of Mn(II) ions by hexacyanoferrates(III) and bistability in the reductions of MnO₂ by hexacyanoferrates(II) in a CSTR, *Chem. Phys. Lett.*, **268**, 505 (1997).
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, 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).
55. V. Tkach, R. Ojani, M.O.G. Espínola *et al.*, A descrição matemática do desempenho eletroanalítico e eletrocatalítico de tetracloroortoquinona na oxidação eletroquímica de sulfito no meio ácido, *Quím. Ciên. Tecn. Soc.*, **3**, 35 (2014).

56. 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).
57. V. Tkach, V. Nechyporuk, P. Yagodynets', I. Rusnak, Los biossensores, basados en los polímeros conductores, y la descripción matemática de su desempeño, *Orbital Elec. J. Chem.*, **4**, 136 (2012).
58. 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).
59. V. Tkach, H. Nascimento, V. Nechyporuk, P. Yagodynets', A descrição matemática do desempenho de sensores e biossensores eletroquímicos de pH, baseados em polímeros condutores, no processo de medição do pH dos líquidos de cavidade bucal no modo de voltagem constante, *Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm.*, **43**, 196 (2014).
60. V. Tkach, B. Kumara-Swamy, R. Ojani, 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, 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).
62. V. Tkach, V. Nechyporuk, R. Ojani, P. Yagodynets', M. Tazyrov, Anales del XXX Congreso Argentino de Química, 22 al 24 de Octubre de 2014, Buenos Aires., URL: <http://aqa.org.ar/pdf101/cd/Qca.Analitica/1-001.pdf>, acesso aos 7 de Febrero de 2015.
63. V. Tkach, S. Tajik, R. Ojani *et al.*, Mecanismo de desempenho eletroanalítico de 2,7-bis(ferroceniletinil)fluoreno-9-ona para eletrodeteção da hidrazina e sua descrição matemática, *Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm.*, **44**, 208 (2015).
64. V. Tkach, V. Nechyporuk, P. Yagodynets', Proceedings of the 1st CQM Annual Meeting and the 9th Materials' Group Meeting of the University of Madeira, 31st of January – 1st of February 2014, Funchal, Região Autónoma da Madeira, Portugal, p. 37.

65. V. Tkach, R. Ojani, V. Nechyporuk, P. Yagodynets, Modelagem matemática do desempenho de eléctrodos, 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).
66. V. Tkach, R. Ojani, V. Nechyporuk, P. Yagodynets', III Encontro em Técnicas de Caracterização em Análise Química, 6 de junho de 2014, Braga, Portugal, p. 72.
67. V. Tkach, S.C. de Oliveira, G. Maia *et al.*, The mathematical investigation for the oxidation of phenolic compounds over $\text{CoO}(\text{OH})$ in alkaline solution, *Mor. J. Chem.*, **4**, 112 (2016).
68. V. Tkach, R. Ojani, V. Nechyporuk, P. Yagodynets', A descrição matemática do desempenho eletroanalítico de nanopartículas de óxido de cobre (II) na eletro-deteção de hidrazina, *Orbital. Elec. J. Chem.*, **6**, 142 (2014).
69. R. Hosseinzadeh, R. Ojani, L. Shabani, Synthesis and electrochemical study of some novel alkynylferrocene derivatives, *Curr. Chem. Lett.*, **3**, 37 (2014).
70. J.B. Raoof, R. Ojani, H. Karimi-Maleh *et al.*, Multi-wall carbon nanotubes as a sensor and ferrocene dicarboxylic acid as a mediator for voltammetric determination of glutathione in hemolysed erythrocyte, *Anal. Meth.*, **3**, 2637 (2011).

Principales hábitos de medicación por los propietarios de caninos que acuden a consulta veterinaria en Pasto, Nariño, Colombia

Juan M. Astaiza Martínez¹, Carmenza J. Benavides Melo², Grace K. Muñoz García³, Melissa F. Mora Muñoz⁴, Carlos A. Cháves Velasquez⁵

Grupo de Investigación en Medicina Interna y Farmacología Veterinaria (MIFARVET), Departamento de Salud Animal, Programa de Medicina Veterinaria, Facultad de Ciencias Pecuarias, Universidad de Nariño, Colombia.

¹ Correo electrónico: *astaizajm@gmail.com*

² Correo electrónico: *benavidesmelo@gmail.com*

³ Correo electrónico: *greis.mv@gmail.com*

⁴ Correo electrónico: *melimv5@gmail.com*

⁵ Correo electrónico: *carlosalberto319@hotmail.com*

Recibido para evaluación: 2 de julio de 2015.

Aceptado para publicación: 8 de febrero de 2016.

RESUMEN

El objetivo de este trabajo es determinar los hábitos de medicación en caninos por parte de los propietarios, antes de la consulta médica, y clasificar los medicamentos utilizados por grupo farmacológico. Para ello se realizó un estudio de utilización de medicamentos por medio de un cuestionario dirigido a 196 propietarios en seis clínicas veterinarias. Se encontró que el 95% de los propietarios medicaban a sus mascotas antes de la consulta médica. En el 6,4 % de los casos no coincidió la medicación que administraron con el diagnóstico final emitido por el médico veterinario, ya que la patología derivaba de otro sistema. El 63% optó por utilizar la vía oral como medio para administrar medicamentos. Las dos formas farmacéuticas más utilizadas fueron la líquida (55,91%) y la sólida (32,8%). El grupo farmacológico más utilizado fue el de los analgésicos no esteroideos (24,73%). Según la correlación fármaco-dosis- frecuencia-patología, el 98% de los propietarios no administraron adecuadamente los medicamentos. Se concluye que los propietarios medican a sus

mascotas sin recomendación del médico veterinario, la mayoría de ellos lo realizan con productos no aprobados para uso en caninos, y las dosis utilizadas son incorrectas y no tienen en cuenta la frecuencia de administración.

Palabras clave: Dueños, fármacos, formulación, mascotas.

SUMMARY

Main medication habits in dogs made by their owners who come to veterinary consultation in Pasto, Nariño, Colombia

The main objective of this work is determining the habits of medication in dogs by the owners before the veterinary consultation, and to classify the drugs used by pharmacological group. A study of drug use was performed by means of a questionnaire sent to 196 owners in six veterinary clinics. In 95% of owners, medication habits were evidenced before medical consultation. In 6.4% of cases, administered medication to pets did not match with the final diagnosis issued by the veterinarian, since the pathology derived from another system. 63% opted for using mouth for giving medication. The two pharmaceutical forms most used were liquid (55.91%) and solid (32.8%). The most used pharmacological group was the non-steroidal analgesics (24.73%). According to the drug-dose-frequency-pathology correlation, 98% of owners did not administer medications properly. The findings are: the owners medicate their pets without veterinary doctor recommendation, most of them do it with products which are not approved for being used in dogs, and doses used are incorrect and do not take into account the frequency of administration.

Keywords: Owners, drugs, formulation, pets.

INTRODUCCIÓN

La selección de un fármaco apropiado para la terapéutica empieza con el establecimiento de un diagnóstico preciso. Una vez que el médico veterinario ha establecido el diagnóstico de la enfermedad o disfunción en el paciente, decide sobre las distintas opciones para la terapéutica que se basa en la comprensión del proceso patológico y la farmacología de los posibles medicamentos a elegir[1].

Según Baos, la automedicación se define como el consumo de medicamentos, hierbas y remedios caseros por propia iniciativa o por consejo de otra persona, sin consultar con

el médico, comportamiento que está profundamente influenciado por las condiciones socioculturales y la publicidad farmacéutica[2, 3].

Las mascotas también se pueden ver afectadas por este tipo de conductas, principalmente, por la medicación por parte del propietario [4], conducta que se ve influenciada por la venta libre de medicamentos tanto para uso humano como veterinario[1,5].

Cualquier terapia con fármacos debe considerarse como un riesgo calculado que debe ser sopesado antes del uso de la terapia en cuestión, de ahí que la automedicación implica riesgos por los posibles problemas o eventos relacionados con los medicamentos, que van desde leves hasta graves, según el fármaco y el usuario. Pueden ser tóxicos en casos de sobredosis, produciendo emergencias accidentales, iatrogénicas o intencionales [3]. Su origen está en que no se hace un diagnóstico y el único profesional idóneo y autorizado para ello es el médico veterinario, no los familiares, ni amigos, entre otros[6].

Existen factores que condicionan y favorecen el consumo de medicamentos sin prescripción, como la venta de medicamentos en lugares no autorizados, la escasa accesibilidad al facultativo, el poco tiempo libre de los usuarios y el excesivo incumplimiento de la legislación sobre dispensación de especialidades farmacéuticas que exigen receta médica. La medicación por parte de los propietarios tiene, para la mayoría de los médicos veterinarios, connotaciones negativas al constituir una terapéutica no controlada, la cual deriva habitualmente en uso irracional de los medicamentos, riesgos e incremento de los gastos en salud [6].

De ahí la importancia que el clínico cree conciencia en el dueño de los animales acerca de la necesidad de asistencia técnica especializada, y que no duplique o copie tratamientos en forma mecánica, pues cada caso es distinto y las consideraciones previas y posteriores a la terapéutica sin duda serán diferentes [7].

El estudio de los hábitos de consumo de medicamentos pertenece a la farmacoepidemiología y los posibles efectos adversos se estudian en la farmacovigilancia. Esta se fundamenta en el uso de medicamentos sin respetar las instrucciones del etiquetado o se utilizan medicamentos que no han sido registrados para uso veterinario lo cual es muy frecuente en la medicina de pequeños animales [8].

El objetivo del presente estudio fue determinar los hábitos de medicación en caninos por parte de los propietarios antes de la consulta médica en la ciudad de Pasto.

METODOLOGÍA

La metodología seguida fue muy similar a la descrita por Revelo *et al.* [9].

Localización

El estudio se realizó en seis clínicas de miembros de la Asociación Colombiana de Médicos Veterinarios dedicados a la Clínica de Pequeños Animales (VEPA), ubicadas en la zona urbana del municipio de Pasto, en el departamento de Nariño, Colombia.

Tipo de estudio

Es un estudio observacional descriptivo de corte transversal, basado en los hábitos de indicación-prescripción por parte de los propietarios de caninos.

Selección y cálculo de la muestra

Se realizaron 196 cuestionarios basados en el porcentaje de propietarios que probablemente asistirían a cada clínica veterinaria. Esta probabilidad se determinó con la siguiente ecuación:

$$n = \frac{Z^2 p(1-p)}{e^2}$$
$$n = \frac{(1,96)^2 (0,25)}{(0,07)^2} = 196 \text{ cuestionarios.}$$

Con un porcentaje de confiabilidad del 95 %, una probabilidad menor o igual a 0,25 y un margen de error del 7 %, dando como resultado 196 cuestionarios que fueron aplicados en las clínicas seleccionadas.

Recolección de la información

Para el levantamiento de la información se diseñó una encuesta de 7 preguntas abiertas sobre los hábitos de medicación dirigidas al propietario, y una para el médico veterinario encargado.

Criterios de inclusión

Propietarios que lleguen a consulta a las clínicas veterinarias y médicos veterinarios que colaboren con el desarrollo del estudio.

Criterios de exclusión

Propietarios y profesionales que no aporten suficiente información para el estudio y la falta de colaboración.

Variables a analizar

Clínicas: motivo de consulta.

Farmacológicas: medicamento que utilizó el propietario, dosis, vía de administración, frecuencia.

La información se organizó en tablas de frecuencia según las características de cada variable.

Análisis estadístico

Después de recolectar los datos, se realizó un análisis de tipo descriptivo para estimar las frecuencias y sus respectivos valores en porcentaje de cada una de las variables. Lo anterior con el objetivo de realizar una caracterización de los patrones de utilización de medicamentos.

Los datos obtenidos se registraron en una base de datos en MS Excel para su posterior análisis con el paquete estadístico *Statgraphics Plus 5.0*.

Debido a la naturaleza cualitativa de la información, se emplearon tablas de frecuencia para organizar los datos y observar el comportamiento de las poblaciones dentro de las categorías que se tomaron en cuenta para cada una de las variables, esto con el fin de realizar un análisis descriptivo acerca del manejo de los diferentes fármacos utilizados por los propietarios de caninos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el estudio se evidenció que el 95% de los propietarios medican a sus mascotas antes de asistir a consulta veterinaria, y solo el 5% de ellos acuden directamente a los centros médicos cuando su mascota se encuentra enferma.

Personas que recomiendan la medicación

El 74% de los propietarios que medicaron a sus mascotas antes de la consulta médica recibieron recomendación de otras personas o medios virtuales y el 26% lo hizo por iniciativa propia.

Los centros de expendio de medicamentos como centros agropecuarios o droguerías también fueron incluidos en este estudio, ya que los propietarios reportan solicitar asesoría en estos lugares cuando sus mascotas se encuentran enfermas. La recomendación por un familiar representada con un 19 % (ver tabla 1), concuerda con lo reportado por Mondaca (17,7%)[5].

Los vecinos están dentro de las personas que recomendaron medicar a las mascotas, entre los que se encuentran profesionales de enfermería, zootecnia y estudiantes de medicina

veterinaria. Las recomendaciones emitidas por estudiantes de veterinaria (2%), centros agropecuarios (3%), zootecnistas (3%), así estén relacionados con la salud animal, contradicen lo afirmado en la Ley 073 de 1985 COMVEZCOL, artículo 3, parágrafo: la prescripción de drogas o productos biológicos de uso animal solo podrá hacerse por los profesionales médicos veterinarios o médicos veterinarios zootecnistas [10].

Tabla 1. Personas que dan la recomendación

Recomendación	N.º	%
Propietario	51	26
Familiar	48	25
Centro agropecuario	26	13
Droguería	20	10
Internet	12	6
Clínica veterinaria	10	5
Total	196	100

El 6% de los propietarios utilizaron *internet* para consultar sobre la sintomatología de su mascota y su probable tratamiento, debido a la facilidad de acceso a la información en los buscadores en la red e innumerables páginas y blogs dedicados a las mascotas.

Motivo de consulta y concordancia con el diagnóstico emitido por el médico veterinario

El principal motivo de consulta y medicación fue piel y anexos con un 33,3%, porcentajes similares fueron encontrados en anteriores trabajos realizados en la ciudad de Pasto (41,93%) [11] y en la ciudad de Medellín (25,3%) [12] (ver tabla 2). Debido a que estas patologías son observadas y percibidas con mayor facilidad que las anomalías de otros sistemas. La patología que más se presentó en el estudio fue la dermatitis alérgica por picadura de pulga.

El sistema digestivo también representó un porcentaje importante en cuanto a medicación por parte de los propietarios con un 25,8% siendo similar al porcentaje por motivo de consulta encontrado en el trabajo de la Universidad Nacional de Colombia [13] con un 23%, y en las ciudades de Medellín [12] y San Juan Pasto [11]. El sistema músculo-esquelético y ocular también tuvieron porcentajes representativos, siendo las heridas por mordedura la principal causa por la cual fueron medicados.

Relacionando el motivo de consulta con el diagnóstico final emitido por el médico veterinario, se evidenció que en el 93,5% de los casos hubo concordancia con el motivo por el cual fue medicado por su propietario.

Tabla 2. Motivo de consulta y concordancia con el diagnóstico médico veterinario

Sistema	Número	%	Concordancia del diagnóstico			
			Si	%	No	%
Piel y anexos	62	33,3	58	93,5	4	6,4
Digestivo	48	25,8	43	89,5	5	10,4
Músculo esquelético	32	17,2	32	100		
Ocular	23	12,3	23	100		
Respiratorio	12	6,4	9	75	3	25
Urinario	4	2,1	4	100		
Reproductivo	3	1,6	3	100		
Neurológico	2	1	1	50	1	50
Total	186	100	173	93,5	13	6,4

Vía de administración y forma farmacéutica

Las dos formas farmacéuticas más utilizadas fueron la líquida (55,91%) y la sólida (32,80%), siendo las suspensiones orales las que se administraron con mayor frecuencia (ver tabla 3), resultados similares fueron encontrados en el estudio realizado en la Universidad Nacional [13] donde estas representaron el 45%, seguido de las aguas aromáticas, sin embargo, estas no solo se utilizaron por vía oral sino también por vía tópica. De las forma farmacéuticas sólidas las más utilizadas fueron las tabletas con el 80%.

El 63% de los propietarios optó por utilizar la vía oral como medio para administrar medicamentos, el 36% eligieron la vía tópica y el 1% la vía parenteral. El uso de la vía oral se debe a su facilidad de administración, independientemente del sistema afectado.

Las formas farmacéuticas por vía tópica más utilizadas fueron, colirios, crema, ungüento, pomada, spray y solución gel.

Tabla 3. Forma farmacéutica

Formas farmacéuticas		Frecuencia	%
Líquidas (55,91%)	Suspensión oral	44	23,66
	Aguas aromáticas	29	15,59
	Soluciones	11	5,91
	Colirio	8	4,30
	Emulsión	6	3,23
	Jarabe	4	2,15
	Spray	2	1,08
Sólidas (32,80%)	Tabletas	49	26,34
	Cápsulas	12	6,45
Semisólidas		20	10,75
Gaseosas		1	0,54
Total		186	100

Clasificación de los medicamentos

Grupo farmacológico

El grupo farmacológico más utilizado fue el de los analgésicos no esteroideos (AINES) con el 24,73%, seguido de los misceláneos con el 19,89% y los antibióticos con el 13,98% (ver tabla 4).

Tabla 4. Clasificación por grupo farmacológico

Grupo farmacológico	N.º	%
Analgésicos no esteroideos (AINES)	46	24,73
Misceláneos	37	19,89
Antibióticos	26	13,98
Antiparasitarios internos y externos	15	8,06
Vitaminas y minerales	9	4,84
Corticoides	7	3,76
Antiácidos e inhibidores de la acidez gástrica	7	3,76
Medicamentos con varios principios activos	6	3,23
Antifúngicos	5	3,23
Más de dos medicamentos	6	2,69
Antieméticos	5	2,69
Antihistamínicos	5	2,69
Laxantes	3	1,61
Mucolíticos	2	1,08
Antiespasmódicos	2	1,08
Otros*	5	2,69
Total	186	100

*Otros: antidiarreicos, broncodilatadores, antivirales, contraírritantes y rubefacientes

El uso de analgésicos por parte de los propietarios se debe a la facilidad de adquisición de estos. Sin embargo, el manejo de AINES no recomendados para uso en caninos es un problema, ya que los propietarios no conocen los efectos secundarios de su mala administración.

En el grupo misceláneo se encontró el uso de plantas medicinales en agua de bebida o en aplicaciones a través de paños. Si bien las plantas medicinales son beneficiosas para el ser humano así como para los animales, se deben considerar los riesgos de toxicidad. La seguridad de estas casi nunca es absoluta por lo que jamás se debe recurrir a ellas sin

la correspondiente recomendación de los expertos. Es necesario también conocer la descripción de las plantas así como también la dosificación de estas para lograr un uso apropiado [14]. De otro lado, el uso de antibióticos fue menor al reportado por Gutiérrez en Medellín (48%) [12].

El suministro de antiparasitarios internos y externos fue bajo (8,06%), contrario a lo reportado por Mondaca [5], donde el 34,37% de los propietarios administraron un antiparasitario a su mascota, esto asociado a que son productos de fácil adquisición tanto en centros agropecuarios como en clínicas veterinarias, no necesitan prescripción médica, y su dosificación está especificada en su empaque.

El uso de vitaminas y minerales es muy frecuente entre los propietarios, aunque solo está representado por el 4,84 %, siendo los problemas dermatológicos una de las principales indicaciones, por la creencia de que estos se asocian a deficiencias en la alimentación.

La medicación con corticoides fue de 3,76%. Desde 1960, los corticoides han sido utilizados para el alivio del prurito e inflamación cutánea tanto en humanos como en animales debido principalmente, a su alta efectividad. Sin embargo, una de las características negativas son sus reacciones adversas marcadas [15]; estos efectos pueden exacerbarse aún más por el uso inadecuado por dosis y frecuencias erróneas.

Dosificación de medicamentos por parte de los propietarios

Al interrogar a los propietarios sobre las dosis, utilizan términos como: “una cucharada”, “un cuarto de la pastilla” o “una pizca”, de lo que se puede concluir que no conocían la dosis exacta de medicamento que ingresó al organismo de la mascota, siendo más difícil cuantificar y conocer si fueron bien o mal dosificados. Los propietarios tienden a utilizar en sus mascotas dosificaciones para niños, lo que en algunos casos pueden poner en peligro la vida de las mascotas.

Dosificación de AINES

Los antiinflamatorios como el Ibuprofeno (30%) y los analgésicos como el Acetaminofeno (40%) se encuentran entre los fármacos que más utilizaron los propietarios en su mascota. Este tipo de medicamentos, muy generalizados entre las personas, se utilizan por sus cualidades para prevenir o minimizar la inflamación de ciertos tejidos y disminuir el dolor, sin tener en cuenta la dosis correcta o concentración del medicamento, la dosificación que más utilizan es la recomendada en niños.

El 34,7% de los analgésicos utilizados se subdosificaron, el 17,3% fueron sobredosificados, del 13% no se conoce la dosis administrada, y solo el 4,3% se administró a dosis correcta (ver tabla 5).

Tabla 5. Dosificación de medicamentos AINES

Medicamento		Dosificación			
		Subdosificado	Sobredosificado	No se conoce	Correcta
		%	%	%	%
Acetaminofeno	17	58,8	23,5	11,7	5,8
Diclofenaco	5	20	0	60	20
Ibuprofeno	14	0	0	0	0
Meloxicam	5	80	20	0	0
Ketoprofeno	1	100	0	0	0
Naproxeno	4	100	75	25	0
Total	46	34,7	17,3	13	4,3

No se ha establecido la dosis segura del Ibuprofeno, su uso en medicina veterinaria está contraindicado por sus efectos al igual que el paracetamol o acetaminofeno. El índice terapéutico del Ibuprofeno en los perros es bajo, y lo eliminan muy lentamente, por ello no se recomienda su uso en esta especie, además, se observaron signos tóxicos gastrointestinales con dosis a 8mg/kg [16].

El Naproxeno tiene un empleo difundido en seres humanos y se ha indicado en el manejo del dolor músculo-esquelético crónico en perros. Sin embargo, la incidencia de efectos adversos es relativamente elevada por lo cual el Naproxeno parece tener pocos beneficios terapéuticos en comparación con otros AINES más eficaces y seguros [17].

Meloxicam está entre los AINES más usados en medicina veterinaria, para muchas patologías músculo-esqueléticas, o como manejo posquirúrgico, al ser de uso veterinario sus presentaciones farmacéuticas facilitan su administración.

El Diclofenaco, en veterinaria, es utilizado como coadyuvante en patologías oculares como: uveítis anterior, iritis, y también, para cirugías intraoculares. Sin embargo, este medicamento está registrado únicamente para su uso en seres humanos, el manejo de este debe hacerlo solamente un médico veterinario, ya que como cualquier AINE puede causar efectos secundarios en algunos animales.

Las formas farmacéuticas más utilizadas de los AINES fueron las tabletas y gotas pediátricas, y de los medicamentos dosificados correctamente (Acetaminofeno, Diclofenaco), la frecuencia de administraron fue incorrecta en el 100% de los casos.

Dosificación de medicamentos misceláneos

En este grupo se incluyen los productos naturales o productos que no tienen uso farmacológico en veterinaria y los medicamentos de los cuales se desconoce su principio activo.

Los propietarios generalmente utilizaron estos productos para trastornos digestivos, oculares o cuando las mascotas presentaban heridas. Esta situación también ocurre en el estudio realizado por Mondaca [5], quien reporta un elevado uso de estas hierbas medicinales, de ahí que sea importante señalar que los propietarios confían mucho en la acción de los productos naturales, pero también es recomendable consultar sobre el uso de estos en medicina veterinaria.

Existe una tradición arraigada en el conocimiento de las propiedades medicinales de las plantas aplicadas para restablecer la salud animal. Muchas de estas hierbas son conocidas popularmente y promocionadas como seguras y eficaces. Sin embargo, las plantas medicinales son medicamentos y como tales deben ser consumidos bajo la supervisión de un farmacéutico o un profesional de la salud, ya que este puede aconsejar al paciente cuál es la posología indicada, cómo debe administrarse e iniciarse el tratamiento y sobre todo, indicarle el tratamiento fitoterápico más adecuado, para evitar contraindicaciones e interacciones con otros fármacos. Además, para garantizar la eficacia del tratamiento con plantas medicinales es aconsejable emplear productos controlados y estandarizados [14].

El 100% de los propietarios desconocía la dosis administrada y respecto a la frecuencia ningún medicamento fue dosificado correctamente (ver tabla 6).

Tabla 6. Dosificación de medicamentos misceláneos

Medicamento	No se conoce dosificación	
	No	%
Manzanilla	14	38,8
Sábila	6	16,6
Canela	3	8,3
Azufre	2	5,5
Uvilla	2	5,5
Vinagre	2	5,5
Mentol alcanfor y salicilato de metilo	1	2,7
Panela	1	2,7
Ajo	1	2,7
Clorox	1	2,7
Crema dental	1	2,7
Suero oral veterinario	1	2,7
Bloqueador solar	1	2,7
Total	36	100

Dosificación de medicamentos antibióticos

El grupo de los betalactámicos fue el más utilizado por los propietarios con el 57%, seguido de las tetraciclinas con el 15% (ver tabla 7).

En el grupo de los betalactámicos, el antibiótico de mayor uso fue la Cefalexina con el 34,6%, seguida por la amoxicilina con el 26,6%. Del grupo de las tetraciclinas, la oxitetraclina fue la única utilizada por los propietarios (ver tabla 7).

Tabla 7. Dosificación de medicamentos antibióticos

Grupo farmacológico	Medicamento	Total	Dosificación							
			Subdosificado		Sobredosificado		No se conoce		Correcta	
			N.º	%	N.º	%	N.º	%		%
Betalactámicos 57%	Cefalexina	9	2	22	2	22			5	56
	Amoxicilina	4	2	50					2	50
	Ampicilina	2			1	50			1	50
Quinolonas (2%)	Enrofloxacin	1							1	100
Aminoglicósido (8%)	Gentamicina	2	1	50			1	50		
Nitroimidazoles (8%)	Metronidazol	2	2	100						
Tetraciclinas (15%)	Oxitetraciclina	4	3	75			1	25		
Sulfas potenciadas (8%)	Trimetropim-Sulfadiazina	2	1	50	1	50				
Total		26	11	42,3	4	15,3	2	7,69	9	34,6

Se emplearon los antibióticos, principalmente, para patologías dermatológicas, diarreas y en problemas oculares.

En cuanto a la relación dosis y frecuencia de medicamentos antibióticos, en su mayoría (42,3%) estuvieron subdosificados. De los 9 casos que fueron dosificados correctamente con antibióticos, el 67% utilizaron frecuencias de administración inadecuadas.

Las tabletas y las suspensiones fueron las formas farmacéuticas más utilizadas para su administración.

Dosificación de medicamentos antiparasitarios externos e internos

El antiparasitario más utilizado fue el pamoato de pirantel y prazicuantel con el 46,6%. El 66,67 % de los antiparasitarios fueron sobredosificados, seguido del 18,75 % que

corresponde a los propietarios que no recordaban la dosis aplicada o administrada a su mascota (ver tabla 8).

Tabla 8. Dosificación de medicamentos antiparasitarios externos e internos

Medicamento	Total	Dosificación					
		Subdosificado		Sobredosificado		No se conoce	
		N.º	%	N.º	%	N.º	%
Pamoato de pirantel y prazicuantel	7	1	6,67	6	40		
Fipronil	3			1	6,67	2	
Amitraz	2	1	6,67		0	1	
Prazicuantel, febantel, pirantel	2			2	13,33		
Triclorphon, metrifonato	1			1	6,67		
Total	15	2	13,33	10	66,67	3	18,75

La venta libre de los antiparasitarios favorece la administración por parte de los propietarios, quienes manifiestan utilizarlos para problemas digestivos, situación similar a la observada por Mondaca [5] acerca de la inadecuada desparasitación con respecto a dosis, frecuencia y producto a utilizar.

En cuanto a dosis y frecuencia, ninguno de los antiparasitarios fue administrado correctamente.

Dosificación de vitaminas y minerales

En el 56 % de los casos no se conocía la dosis administrada y el 22 % se encontraba subdosificado o sobredosificado (ver tabla 9).

Dosificación de corticoides

En el 71,4% de los casos se desconoce la dosis administrada y en el 14,3% fueron subdosificados (ver tabla 10).

La mayoría de corticoides utilizados eran tópicos y, además, eran de fácil adquisición por lo que el propietario generalmente los utilizaba en patologías dermatológicas o heridas.

Dosificación de más de dos medicamentos

Algunos propietarios optaron por utilizar más de dos medicamentos en su tratamiento, de los cuales el 20 % estuvieron subdosificados, 5% sobredosificados y en el 75% de los casos el propietario no recordaba la dosis administrada.

Tabla 9. Dosificación de vitaminas y minerales

Medicamento	Total	Dosificación					
		Subdosificado		Sobredosificado		No se conoce	
		N. °	%	N. °	%	N. °	%
Lindopel	3	1	33,3	1	33,3	1	33,3
Vitaminas Bayer	1					1	11
Multivitamínico	1			1	11		
Bullymax	1					1	100
Vitamina c	1					1	100
Fosfycal	1	1	100				
Ensure	1					1	100
Mirrapel	1					1	100
Total	9	2	22	2	22	5	56

Tabla 10. Dosificación de corticoides

Medicamento	Total	Dosificación					
		Subdosificado		Sobredosificado		No se conoce	
		N. °	%	N. °	%	N. °	%
Betametasona	3					3	42,8
Prednisolona	2	1	14,3	1	14,3		
Hidrocortisona	2					2	28,6
Total	7	1	14,3	1	14,3	5	71,4

El principal uso de combinaciones de medicamentos como manzanilla, antibióticos, antiinflamatorios y desinfectantes fue para controlar infecciones en heridas.

Dosificación de medicamentos con más de dos principios activos

En el 16,6 % de los casos no se conoce la dosis administrada y el 83 % fueron dosificados correctamente (ver tabla 14).

De los medicamentos administrados en dosis correcta la frecuencia de administración fue adecuada en el 60% de los casos.

La mayoría de los medicamentos, con más de dos principios activos, eran tópicos para problemas de piel, oculares u óticos, los cuales son de venta libre y de fácil adquisición. Según la correlación fármaco-dosis-frecuencia-patología, el 98% de los propietarios no administraron adecuadamente los medicamentos.

Tabla 14. Dosificación de medicamentos con más de dos principios activos

Medicamento	Total	Dosificación							
		Subdosificado		Correcta		Sobredosificado		No se conoce	
		N.º	%	N.º	%	N.º	%	N.º	%
Cutamycon	2			1	66,6			1	33,3
Dexoryl	1			1	100				
Dermosyn	1			1	100				
Restaderm	1			1	50				
Dermopet	1			1	100				
Total	6	0	0	5	83,3	0	0	1	16,6

CONCLUSIONES

Los propietarios medican a sus mascotas sin recomendación médico veterinaria, para lo cual utilizan medicamentos no aprobados para su uso en caninos, en dosis y frecuencias incorrectas generalmente. El manejo inadecuado de los medicamentos predispone a riesgos toxicológicos en las mascotas, retraso en el inicio de los tratamientos por parte del profesional y puede producir interacciones farmacológicas no deseadas.

REFERENCIAS

1. M. Novotny, Clinical Pharmacology: Principles of therapeutics. En: "Veterinary Pharmacology and Therapeutics", 8.th ed., Editado por R. Adams, Blackwell Publishing Professional, Iowa, 2001, pp. 57-67.
2. V. Baos, Estrategias para reducir los riesgos de la automedicación, *Información Terapéutica del Sistema Nacional de Salud*, 24(6), 147-152(2000).URL: <http://www.msc.es/biblioPublic/publicaciones/docs/200006-2.pdf>, consultado en julio de 2013.
3. F. Tobón, Estudio sobre automedicación en la Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia, *Iatreia*, 15(4), 242-247 (2002).
4. M. Luengo, J. Gutiérrez-Aragón, Tratamiento de urgencia de las intoxicaciones más frecuentes en perros y gatos parte I. *VET-UY Agro y Veterinaria*. URL: <http://www.veterinaria.org/asociaciones/vet-uy/articulos/pequenos/050/0003/peq0003.htm>, consultado en agosto de 2013.

5. C. Mondaca, "Uso de medicamentos por parte de propietarios de mascotas", Tesis de grado, Universidad Iberoamericana de Ciencias y Tecnología, Santiago de Chile, 2006, p. 93.
6. J. López, V. Abarca, P. Paredes, E. Inzunza, Parásitos intestinales en caninos y felinos con cuadros digestivos en Santiago, Chile: Consideraciones en Salud Pública, *Rev. Méd. Chile*, **134**(2), 193-200 (2006).
7. H. Sumano, L. Ocampo, "Farmacología veterinaria", 3a ed., McGraw-Hill Interamericana, Madrid, España, 2006, p. 34.
8. D. Iragiien, S. Urcelay, B. San Martín, Farmacovigilancia en medicina veterinaria: una perspectiva desde el punto de vista internacional y situación actual en Chile, *Arch. Med. Vet.*, **39**(3): 195-206 (2007).
9. A. Revelo, M. Tobar, C. Benavides, J. Astaiza, Estudio de utilización de medicamentos recomendados por almacenes agropecuarios para explotaciones cuyí-colas de Pasto, Nariño, Colombia, *Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm.*, **41**(2), 143-156 (2012).
10. Colombia, Congreso de la República, Ley 73 de 1985 (octubre 8), "por la cual se dictan normas para el ejercicio de las profesiones de medicina veterinaria, medicina veterinaria y zootecnia, y zootecnia", Bogotá, 1985.
11. J. Bastidas, G. Cabrera, "Estudio sobre la utilización de antibióticos en pequeños animales en la clínica Carlos Martínez Hoyos Universidad de Nariño en el periodo comprendido entre abril de 2006 y abril de 2008", Tesis de Grado, Universidad de Nariño, Pasto, Colombia, 2008, p. 109.
12. F. Gutiérrez, J. Ruiz, E. Molina, B. Toro, Caracterización retrospectiva de los indicadores farmacoepidemiológicos en la prescripción medicamentosa en las especies de compañía de Medellín, *Rev. Colomb. Cienc. Pecuár.*, **15**(1), 68-79 (2002).
13. P. Cabrera, "Utilización de antibióticos de uso humano en caninos y felinos atendidos en la clínica de pequeños animales de la Universidad Nacional de Colombia. Bogotá D.C", Tesis de Grado, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, 2010, p. 72.
14. L. Villalobos, "Manual de plantas medicinales para curar animales domésticos en la comunidad de Pacora, Managua, Nicaragua", Universidad Nacional Agraria, 2006.
15. A. Cordero, Corticoides y ciclosporina, VETDERM: Dermatología Veterinaria Especializada. URL: <http://www.norvet.com.mx/wp-content/uploads/2011/09/>

Corticoides-y-Ciclosporina-DR-ALBERTO-MARTIN-CORDERO.pdf, consultado en julio de 2013.

16. L. Botana, F. Landoni, T. Martínez-Jiménez, "Farmacología y terapéutica veterinaria", McGraw-Hill Interamericana, Madrid, 2002, p. 366.
17. J. Maddison, S. Page, P. Church, "Small Animal Clinical Pharmacology", 2nd ed., Saunders Ltd., London, 2008, p. 305.

Validación de una metodología analítica para la cuantificación de polifenoles totales, en procesos de extracción asistida por microondas sobre frutos de la especie colombiana *Vaccinium meridionale*

Wilfred E. Espinosa Manrique^{1*}, Luis C. A. Garzón Salcedo², Oscar J. Medina Vargas^{1**}

¹ Grupo de Investigación en Química y Tecnología de Alimentos, Facultad de Ciencias, Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia, Avenida Central del Norte 39-115, Código postal 150003, Tunja, Boyacá, Colombia.

* Correo electrónico: wilfred.espinosa@uptc.edu.co

** Correo electrónico: oscar.medina@uptc.edu.co

² Grupo de Investigación Núcleo, Facultad de Ciencias e Ingeniería, Universidad de Boyacá, Carrera 2ª Este No. 64-169, Código postal 150003, Tunja, Boyacá, Colombia. Correo electrónico: lcgazon@uniboyaca.edu.co

Recibido para evaluación: 18 de octubre de 2015.

Aceptado para publicación: 8 de febrero de 2016.

RESUMEN

En este trabajo se muestra el desarrollo y la validación de un método analítico para la cuantificación de polifenoles totales con el reactivo de Folin-Ciocalteu (F-C), en procesos de extracción asistida por microondas (MAE), sobre frutos de la especie colombiana *Vaccinium meridionale*. Los resultados obtenidos en los parámetros selectividad, linealidad, repetibilidad y exactitud muestran que la metodología propuesta es confiable para evaluar el efecto de las condiciones de extracción sobre la cantidad de polifenoles removidos.

Palabras clave: Validación de métodos analíticos, extractos vegetales, polifenoles, reactivo de Folin-Ciocalteu, *Vaccinium meridionale*, extracción asistida por microondas.

SUMMARY

Validation of an analytical method for quantification of total polyphenols in microwave-assisted extraction processes for the Colombian species *Vaccinium meridionale*

In this work, we show the development and validation of an analytical method for quantification of total polyphenols with Folin-Ciocalteu reagent (F-C) in microwave-assisted extraction processes for Colombian species *Vaccinium meridionale*. Experimental results of selectivity, linearity, repeatability and accuracy evidence that the methodology proposed is reliable to evaluate the effect of the extraction conditions over the quantity of polyphenols removed.

Keywords: Validation of analytical methods, Plant extracts, Polyphenols, Folin-Ciocalteu reagent, *Vaccinium meridionale*, Microwave-assisted extraction.

INTRODUCCIÓN

Actualmente, existe un notable interés de la comunidad científica por conocer y aplicar las propiedades benéficas de alimentos naturales con actividad antioxidante. La evaluación de esta actividad biológica es de naturaleza compleja, ya que los alimentos están constituidos por una gran variedad de compuestos químicos, y se torna difícil el estudio farmacológico de las distintas interacciones moleculares que tienen lugar al interior de un organismo luego de su ingesta; en particular, el conocimiento de posibles efectos sinérgicos.

Las moléculas con capacidad antioxidante han sido clasificadas en cuatro grandes grupos [1]: enzimas (superóxidodismutasa, glutatión peroxidasa, catalasa, ferroxidasa); macromoléculas (albúmina, ferritina); moléculas pequeñas (ácido ascórbico, glutatión, ácido úrico, tocoferol, carotenoides, polifenoles) y hormonas (estrógenos, angiotensina, melatonina). Estos compuestos contribuyen a la prevención de enfermedades relacionadas con fenómenos de estrés oxidativo [2].

Por su parte, los metabolitos secundarios denominados polifenoles son considerados los compuestos antioxidantes más importantes de la dieta, contienen grupos funcionales hidroxilo sobre anillos aromáticos. Son una gran familia conformada por un conjunto muy variado de moléculas, desde las más simples (como lo es un anillo aromático con uno o más grupos hidroxilos), hasta las más complejas (como polímeros de alto peso molecular). A estos compuestos no solo se les ha atribuido propiedades antioxidantes, existen también entre otros, reportes de actividad antiinflamatoria y antimicrobiana [3-9].

Aunque los polifenoles se han extraído tradicionalmente con solventes acuosos y no acuosos en reflujo a 90 °C, durante 24 horas [10], en las últimas décadas se han implementado otras técnicas para su extracción. Se destaca la extracción asistida por microondas, conocida por sus siglas en inglés como MAE. En dicha técnica, una muestra de material vegetal y un solvente se exponen a radiación microondas bajo condiciones controladas de temperatura y presión; las moléculas de agua presentes en los sistemas vasculares de las plantas rompen los tejidos, liberan las biomoléculas allí contenidas y se incorporan al solvente. En estas condiciones, el solvente puede incluso alcanzar temperaturas superiores a su punto de ebullición [11]. Comparado con los métodos tradicionales, la técnica MAE ofrece muchas ventajas, como son los cortos tiempos de extracción, un menor consumo de solvente, extractos de mejor calidad, disminución en los costos, entre otras. Existen muchos factores que influyen sobre el proceso de extracción: potencia, temperatura, tiempo de extracción, naturaleza del solvente, relación sólido-solvente, tiempo de contacto del material vegetal con el solvente y tamaño de partícula [12].

Los frutos del género *Vaccinium* (*Ericaceae*) contienen gran cantidad de compuestos polifenólicos, y han sido empleados tradicionalmente por muchas comunidades indígenas con fines nutricionales y terapéuticos. En el presente, varias especies de este género tienen gran importancia en la actividad económica mundial. En Estados Unidos, por ejemplo, son comercializadas de manera significativa las especies *Vaccinium corymbosum* L., *V. angustifolium* Ait., *V. asheireade* y *V. macrocarpon*. Dentro del conjunto de suplementos dietarios, el extracto de *V. macrocarpon* que, frecuentemente, es usado para mantener en buen estado el tracto urinario, ocupa el puesto 14 en popularidad; mientras que el extracto de *V. myrtillus* L. (similar al *V. angustifolium*), se ubica en el puesto 21, gracias a sus efectos benéficos sobre el sistema vascular y la retina. En el 2006 había más de 180 productos fitofarmacéuticos en el mercado con extractos de frutos de este género [13].

Estudios realizados con el uso de algunas especies del género *Vaccinium* han mostrado inhibición de crecimiento de células cancerígenas, mejoramiento de la visión, efectos benéficos sobre desórdenes cardiovasculares, enfermedades degenerativas y estrés oxidativo inducido por la edad, entre otros [14-17]. En Colombia es particular el caso de la especie *Vaccinium meridionale* (su fruto de color rojo oscuro de diámetro entre 5 y 10 mm [18] que se conoce en el altiplano cundiboyacense como “ágraz” o “mortiño”), que habita en la zona Andina entre los 2600 y 4000 m.s.n.m. Un estudio de investigación realizado por Lopera y colaboradores con extractos no alcohólicos de fermentos de este fruto, permitió observar un efecto cardioprotector en ratas [19]. Por su parte, Maldonado y colaboradores encontraron una marcada actividad antioxidante, efectos citotóxicos y antiproliferativos en líneas celulares de cáncer de colon con extractos acuosos de *Vaccinium meridionale* [20].

Con base en lo anterior, y con el ánimo de obtener extractos del fruto *Vaccinium meridionale* con mejores propiedades antioxidantes, nos propusimos estudiar, en procesos de extracción asistida por microondas, el efecto de las condiciones experimentales sobre la cantidad de polifenoles totales removidos a través de su cuantificación, con el método de Folin–Ciocalteu (F–C), siendo el ácido gálico (AG) la molécula de referencia. El reactivo de F–C es una solución acuosa de color amarillo que contiene fosfotungstato-molibdatos capaces de capturar uno o dos electrones en reacciones redox y formar especies de color azul (por ejemplo, el $(\text{PMoW}_{11}\text{O}_{40})^{4-}$), con un máximo de absorción a 760 nm de longitud de onda. En el caso particular de los compuestos fenólicos, el medio se ajusta con bicarbonato de sodio hasta un $\text{pH} \approx 10$ para que los fenolatos formados reduzcan el reactivo de F–C. Las especies coloreadas resultantes son independientes de la estructura de los compuestos fenólicos [2].

La revisión de los antecedentes permitió determinar las siguientes condiciones experimentales [10,11, 21–24]: potencia (300–900 W), temperatura (70–110 °C), relación solvente:fruto seco (Fs) (30:1–70:1 p/p), tiempo (5–15 min) y sistema solvente H_2O – EtOH (0 – 80% EtOH). El análisis de las variables experimentales sobre la eficiencia del proceso extractivo, así como el establecimiento de las mejores condiciones, se efectuará por medio de la metodología de la superficie de respuesta [25, 26].

En ese sentido, el diseño y la validación de una metodología analítica que permita demostrar la confiabilidad de los resultados experimentales, con respecto a la cuantificación de polifenoles totales con el reactivo de F–C en cada uno de los extractos objeto de estudio, es imprescindible. Este artículo muestra los resultados obtenidos en la fase de validación, y en particular, la evaluación de los parámetros selectividad, linealidad, repetibilidad y exactitud.

METODOLOGÍA

Instrumentos y equipos

Balanza analítica Ohaus Explorer EX 224, capacidad 220 g, incertidumbre $\pm 10^{-4}$ g. Espectrofotómetro Hach DR 5000, rango de longitud de onda: 190–1100 nm, precisión de longitud de onda: ± 1 nm entre 200 y 900 nm, precisión fotométrica: 1% entre 0,50–2,0 de absorbancia. Sistema microondas de digestión/extracción Sineo MDS-8G, control de presión al interior del sistema: $0,0\text{--}10,0 \pm 0,01$ MPa, control de temperatura: $0\text{--}300 \pm 1$ °C, frecuencia de microonda: 2450 ± 50 MHz. Centrífuga Hettichrotina 46 S, 4000 rpm máximo. Molino analítico IKAA 11. Sonicador Branson CPX 5800H. Estufa de secado Memmert UM400.

Reactivos

Reactivo del fenol según Folin–Ciocalteu 2N, Merck. Ácido gálico monohidratado Panreac, pureza $\geq 0,99$ en fracción másica (No. CAS: 149-91-7). Agua desgasificada ultrapura (tipo I), sistema Pall Corporation Cascada LS®, conductividad: $0,056 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$. Etanol absoluto para análisis EMSURE®, Merck, (No. CAS: 64-17-5). Carbonato de sodio monohidratado Mallinckrodt R.A., pureza $\geq 0,999$ en fracción másica (No. CAS: 497-19-8).

Material vegetal

Los frutos frescos de la especie *Vaccinium meridionale* fueron obtenidos de un hábitat nativo ubicado en el municipio de Chiquinquirá (Boyacá) de altitud entre 2500-2600 m.s.n.m, precipitación media de 990 mm anuales, temperatura media de $12,9^{\circ}\text{C}$ (máxima de $19,3^{\circ}\text{C}$ y mínima de $7,4^{\circ}\text{C}$). Una vez colectados, se llevaron inmediatamente al Laboratorio de Química y Tecnología de Alimentos de la Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia (Tunja, Boyacá). Allí se efectuó una remoción manual de hojas y tallos, y se hicieron varios lavados con agua desgasificada ultrapura (tipo I). Los frutos limpios se ingresaron a una estufa para su deshidratación.

Obtención del fruto seco

El fruto fresco de *Vaccinium meridionale* se secó en una estufa Memmert UM400 a 40°C hasta que su peso se mantuviera constante por 12 h. Posteriormente, el fruto seco se trituró con un molino analítico IKAA 11, y la muestra se pasó por un tamiz de 0,5 mm. Las partículas que atravesaron el tamiz fueron almacenadas en un desecador y puestas en un congelador a -4°C .

Obtención de los extractos del fruto *Vaccinium meridionale*

Se pesó $400,0 \pm 0,1$ mg de fruta seca (Fs) y se mezcló con $20,0000 \pm 0,0001$ g de sistema solvente (EtOH 0%, EtOH 40% y EtOH 80%). La mezcla obtenida se expuso a ultrasonido por 5 minutos en un sonicador Branson CPX 5800H para su homogenización. Posteriormente, se llevó al sistema microondas de digestión/extracción Sineo MDS-8G, según las condiciones de extracción requeridas. Finalmente, se agitó la mezcla por 15 min y se centrifugó a 4000 rpm, por espacio de 20 min, en una Centrifuga Hettichrotina 46 S. Se le denominó extracto al sobrenadante obtenido. Los extractos totalmente acuosos se almacenaron en un refrigerador a 4°C , y los extractos con etanol en un congelador a -4°C . En cualquier caso, el tiempo transcurrido entre la obtención del extracto y su cuantificación no superó las 24 horas.

Curva de calibración para el ácido gálico

Las soluciones estándar de AG fueron preparadas por pesada. El AG fue puesto en el desecador por lo menos 72 h antes de su uso. La masa se midió con una balanza analítica Ohaus Explorer EX 224, de capacidad 220 g e incertidumbre $\pm 10^{-4}$ g. En cada réplica se pesó un equivalente de 43 mg de AG y se mezcló con agua ultrapura hasta obtener una masa final de 49,8 g. De allí se pesaron seis muestras diferentes, con masas desde 25 hasta 65 mg de solución de AG y se llevaron a un balón aforado de 5 mL. Al balón se le agregaron 125 μ L de reactivo de F-C 2N y se homogenizó por 1 min. Después se adicionaron 400 μ L de solución de carbonato de calcio al 10% (p/p) y se llevó al aforo con agua. Se homogenizó por 30 s y se dejó en un sitio oscuro por 1 h. La solución se llevó a un espectrofotómetro Hach DR 5000 y se midió su absorbancia a 760 nm de longitud de onda.

Cuantificación de polifenoles totales en los extractos

Se pesó una muestra de extracto y se llevó a un balón aforado de 5 mL. A partir de allí se realizó el mismo procedimiento del apartado anterior. La cantidad de polifenoles totales contenidas en el extracto, expresada en mg AG/g Fs (mg de AG por g de fruta seca), se calculó a partir de cada valor de absorbancia, mediante la curva de calibración para el AG y considerando la dilución realizada; y esta fue como se indica en la ecuación 1:

$$\text{mgAG} / \text{gFs} = \frac{\text{mg}_{\text{ste}} \cdot 5 \cdot 10^{-3} \text{ L} \cdot (A - b / m)}{\text{mg}_{\text{ext}} \cdot \text{gFs}} \quad (1)$$

Donde mg_{ste} es la masa (mg) del solvente empleada para producir el extracto, A la absorbancia de la solución diluida, b es el intercepto de la curva de calibración, m es la pendiente de la curva de calibración, mg_{ext} es la alícuota de extracto (mg), y gFs es la masa de fruto seco (g) empleada para producir el extracto.

Selectividad

Estudios anteriores han reportado fenómenos de interferencia para la cuantificación de polifenoles totales con el reactivo de F-C. Entre la familia de compuestos se destacan algunos ácidos orgánicos, bases nitrogenadas, aminoácidos, aminas aromáticas, azúcares, proteínas y cationes metálicos (hierro (II), cobre (I)). Pese a dichos inconvenientes, el método de F-C ha sido ampliamente empleado y recomendado por ser simple y reproducible [1, 2, 9].

Con el objeto de evaluar el efecto del proceso de extracción sobre la cuantificación de polifenoles totales con el reactivo de F-C, se compararon los espectros de absorción molecular de una solución acuosa de AG con extractos acuosos de *Vaccinium meri-*

dionale, empleando el mayor tiempo de extracción (15 min) y los límites superiores e inferiores para concentración de EtOH, temperatura y potencia; esto es: 0% y 80% de EtOH; 70 y 110 °C; 300 y 900 W. Para facilitar la comparación, en cada sistema se empleó la cantidad adecuada para que la absorbancia en la región de máxima absorción se encontrara entre 0,8 y 0,9.

Dado que un extracto vegetal como sistema es una matriz compleja, y además, que no es posible obtener la matriz sin el analito (polifenoles), la selectividad debe ser evaluada por medio de la comparación de pendientes entre curvas de adición estándar [27-28]. En este trabajo se emplearon 4 muestras, en cada una de ellas se adicionó la misma cantidad de estándar (AG) para cada nivel de concentración. Se realizaron seis adiciones consecutivas, desde una concentración equivalente a 3,6 mg/L AG hasta una concentración de 5,1 mg/L AG. La muestra 1 no incluye matriz, la muestra 2 es el extracto obtenido con agua pura como solvente (0% EtOH): la muestra 3 es el extracto obtenido con la mezcla (agua 60%:EtOH 40%) y la muestra 4 es el extracto obtenido con la mezcla (agua 20%: EtOH 80%). Las tres matrices (muestras 2, 3 y 4) fueron obtenidas en las condiciones máximas de extracción definidas para la temperatura, potencia y tiempo; esto es: 110 °C, 900 W y 15 min, respectivamente. Las cuatro curvas fueron comparadas a partir de los valores de sus pendientes por medio de un análisis de varianza (ANOVA). Si las cuatro curvas son paralelas dentro de la incertidumbre experimental, se demuestra que el método es selectivo, ya que el efecto de la matriz sobre la respuesta instrumental es producido únicamente por la presencia del analito en la misma.

Linealidad

Para la evaluar este parámetro se siguieron los lineamientos establecidos por la guía ICH Q2(R1) [29]. Se prepararon seis soluciones de AG con concentraciones 3,9; 5,1; 6,3; 7,5; 8,7; 9,9 mg/L, y se midió la absorbancia de cada una de ellas a 760 nm. En total se emplearon cuatro réplicas. A los resultados experimentales se le aplicaron las pruebas estadísticas C de Cochran, ANOVA y *t* de Student para la linealidad, con un nivel de confianza del 95%.

Límites de detección y de cuantificación

Los límites de detección y de cuantificación fueron determinados por medio de la desviación estándar del blanco [29]. Se midió la absorbancia del reactivo de F-C a 760 nm siete veces en días diferentes. El límite de detección fue calculado con el valor promedio de la absorbancia más tres veces la desviación estándar del blanco, y el límite de cuantificación con el valor promedio de la absorbancia más diez veces la desviación estándar del blanco.

Precisión: repetibilidad

La repetibilidad se evaluó a partir del coeficiente de variación del factor de respuesta [30]. Se realizaron siete réplicas en días diferentes en los límites superior e inferior (9,9 y 3,9 mg/L AG), y en el punto medio del rango (6,9 mg/L AG).

Exactitud

La evaluación de la exactitud se realizó a través del porcentaje de recuperación [27]. Se emplearon tres sistemas solventes: EtOH 0%, EtOH 40% y EtOH 80%. Con tres réplicas, se pesó en cada sistema $400,0 \pm 0,1$ mg de fruta seca (Fs) y se mezcló con $20,0000 \pm 0,0001$ g de solvente. Posteriormente, se llevó a cabo el proceso de extracción con microondas bajo las máximas condiciones definidas (110 °C, 900 W y 15 min), y se determinó la cantidad de polifenoles extraídos en mg AG/g Fs. A este conjunto de ensayos se les denominó “sin AG”. Adicionalmente, se construyó otro conjunto de ensayos en condiciones similares al anterior, y fue denominado “con AG”, al que se le adicionó previamente un equivalente de $30,0 \pm 0,1$ mg de AG al sistema solvente. Con base en los resultados obtenidos se calculó el porcentaje de recuperación, como se muestra a continuación:

$$\% \text{recuperación} = \frac{0,4gFs(\text{mgAG/gFs"conAG"} - \text{mgAG/gFs"sinAG"})}{30\text{mgAG}} \quad (2)$$

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Selectividad

La figura 1 muestra los espectros de absorción molecular obtenidos para la solución patrón de AG y los extractos de *Vaccinium meridionale*. Desde el punto de vista cualitativo, no se apreciaron diferencias significativas entre el espectro de absorción del AG y los espectros de los polifenoles presentes en cada extracto. De allí se puede deducir que las condiciones de extracción seleccionadas no afectan el proceso de cuantificación de polifenoles totales con el reactivo de F-C.

Por su parte, en las figuras 2, 3, 4 y 5 se muestra el comportamiento obtenido luego de realizar la adición estándar de AG en cada uno de los sistemas considerados: sin matriz, matriz 0%, matriz 40% y matriz 80% de EtOH, respectivamente; y en la tabla 1 se presentan los valores de r^2 , intercepto y pendiente para cada sistema estudiado, junto con sus respectivas desviaciones estándar calculadas con el *software* LAB fit [31].

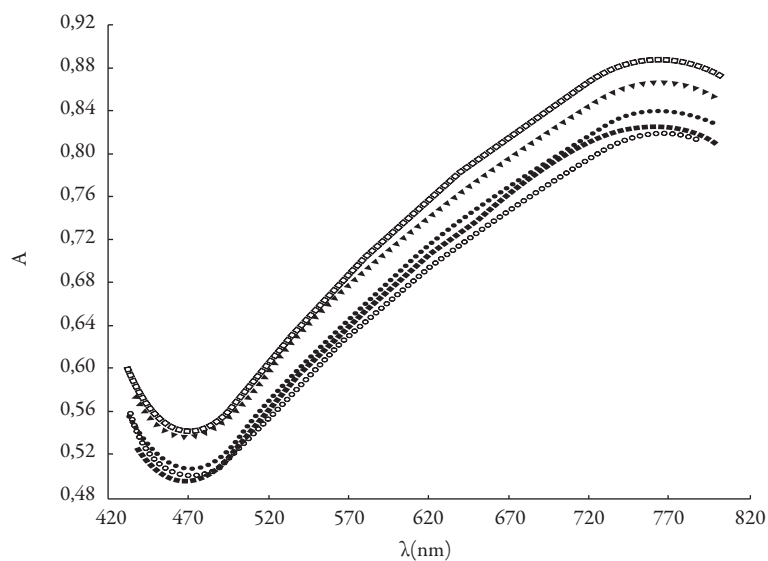


Figura 1. Espectros de absorción molecular (435-800 nm) para solución acuosa de AG (▲); extracto acuoso: 70 °C, 300 W, 15 min (□), 110 °C, 900 W, 15 min (■); extracto 80% de EtOH: 70 °C, 300 W, 15 min (○), 110 °C, 900 W, 15 min (●).

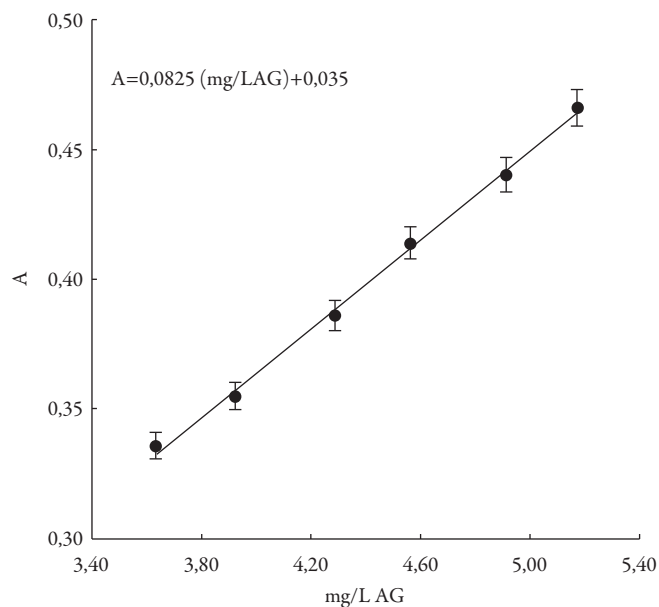


Figura 2. Resultados obtenidos para la adición estándar de AG sin matriz

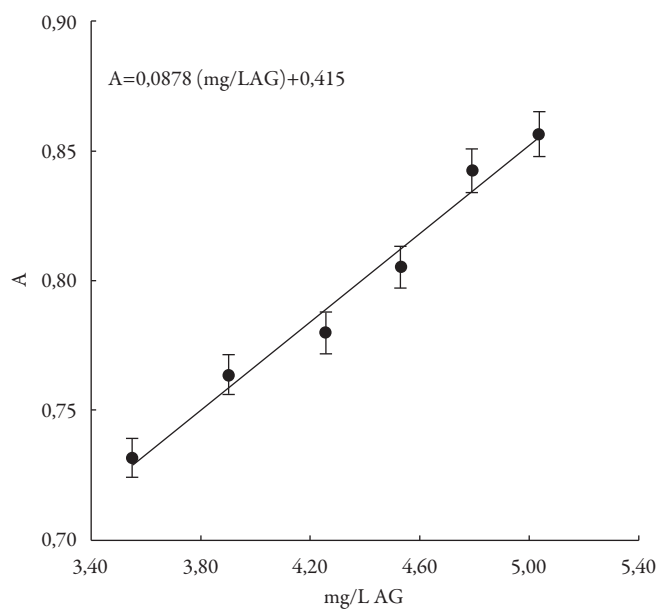


Figura 3. Resultados obtenidos para la adición estándar de AG sobre la matriz 0% de EtOH

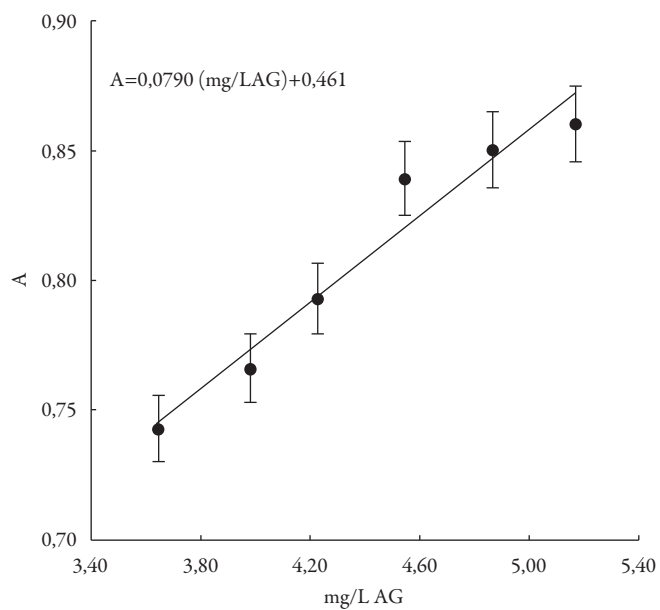


Figura 4. Resultados obtenidos para la adición estándar de AG sobre la matriz 40% de EtOH

Tabla 1. Valores de pendiente, intercepto y r^2 obtenidos en el ensayo de selectividad para los cuatro sistemas estudiados

	1. Sin matriz	2. Matriz: EtOH 0%	3. Matriz: EtOH 40%	4. Matriz: EtOH 80%
Pendiente (b)	$0,0825 \pm 0,0023$	$0,0878 \pm 0,0068$	$0,0790 \pm 0,0106$	$0,0850 \pm 0,0048$
Intercepto (a)	$0,035 \pm 0,010$	$0,415 \pm 0,030$	$0,461 \pm 0,047$	$0,424 \pm 0,021$
r^2	0,997	0,980	0,951	0,988

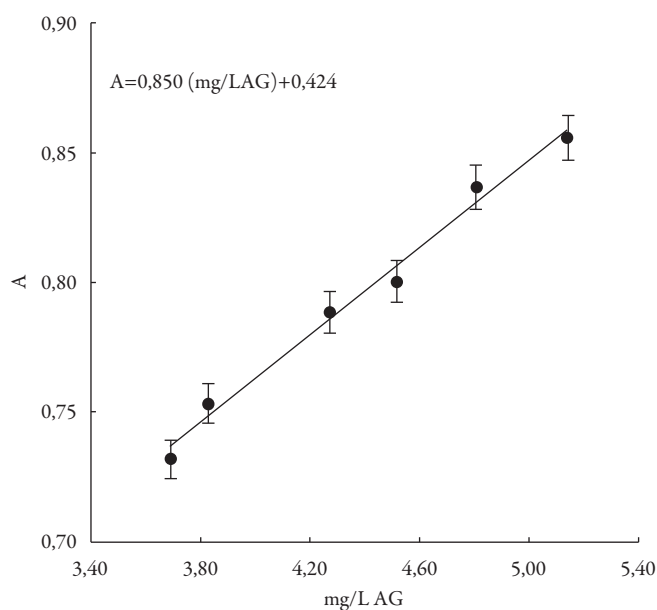


Figura 5. Resultados obtenidos para la adición estándar de AG sobre la matriz 80% de EtOH

Se realizó la prueba ANOVA para evaluar la igualdad de los valores de la pendiente obtenido en cada uno de los sistemas estudiados. Como se puede observar en la tabla 2, y con un nivel de confianza del 95%, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas. Por lo anterior, se infiere que el método es selectivo.

Tabla 2. Resultados de la prueba ANOVA obtenidos para el ensayo de selectividad (nivel de confianza del 95%)

Fuentes de variación	Sumatoria de cuadrados $\cdot 10^4$	Grados de libertad	Cuadrado medio $\cdot 10^5$	F_{exp}	F_{tabla}
Entre grupos	2,52	3	8,41	1,82	3,10
Dentro de los grupos	9,27	20	4,63	—	—
Total	11,79	23	—	—	—

Linealidad

La figura 6 muestra los resultados obtenidos en la cuantificación de polifenoles totales con el reactivo de F-C y AG como molécula de referencia. Allí se presenta la ecuación de la recta, el coeficiente de correlación y la desviación estándar del intercepto y la pendiente.

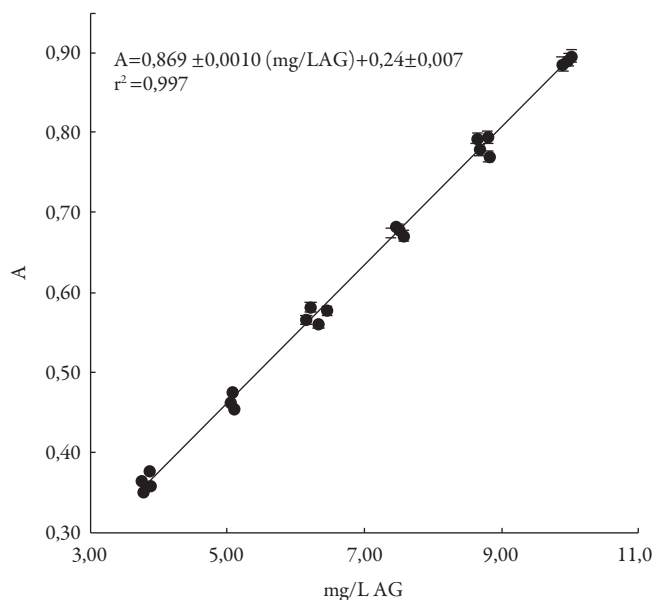


Figura 6. Curva de calibración para la cuantificación de polifenoles totales con el reactivo de F-C

En la tabla 3 se muestran los promedios y varianzas obtenidos para el factor de respuesta en función de la concentración de analito de la curva de calibración. Los resultados encontrados en el test C de Cochran fueron 0,359 para $C_{exp.}$ y 0,532 para $C_{tabla.}$ De allí se puede inferir que la variabilidad de los resultados no depende de la concentración de AG, es decir, se presenta una distribución homocedástica [32].

Los resultados obtenidos en la prueba ANOVA se presentan en la tabla 4, con un nivel de confianza del 95%. Como se puede observar, existe una diferencia estadísticamente significativa de absorbancia para cada valor de concentración de AG (regresión), indicando que el método es sensible a los cambios de concentración; y no se encuentran diferencias estadísticamente significativas entre los resultados de las réplicas para cada una de las concentraciones (linealidad).

Tabla 3. Promedios y varianzas obtenidas para el factor de respuesta en función de la concentración de AG

Concentración promedio (mg/L AG)	Factor de respuesta	
	Promedio	Varianza · 10 ⁶
3,9	0,0944	7,57
5,1	0,0911	3,14
6,3	0,0906	5,26
7,5	0,0903	1,88
8,7	0,0897	3,25
9,9	0,0894	0,01

Tabla 4. Resultados de la prueba ANOVA obtenidos para la curva de calibración de AG con reactivo de F-C a 760 nm (nivel de confianza del 95%)

Fuentes de variación	Grados de libertad	Sumatoria de cuadrados	Cuadrado medio	F _{exp}	F _{tabla}
Regresión	1	0,782	0,782	9944	4,41
Linealidad	4	$8,94 \cdot 10^{-4}$	$2,24 \cdot 10^{-4}$	2,84	2,93
Error puro	18	$1,42 \cdot 10^{-3}$	$7,87 \cdot 10^{-5}$	—	—

Por su parte, en la tabla 5 se muestran los resultados encontrados para la linealidad según la prueba *t* de Student. Con un nivel de confianza del 95%, y *n*-2 grados de libertad, se encuentra una relación directamente proporcional entre la concentración de AG y la respuesta analítica (A), para el rango comprendido entre 3,9 y 9,9 mg/L AG. La pendiente es estadísticamente diferente de 0 ($\beta \neq 0$), y el intercepto no es estadísticamente diferente del valor encontrado para el blanco ($\alpha = 0,015$), como se muestra en la sección límite de detección y de cuantificación. De acuerdo con esto se puede inferir que los errores sistemáticos no afectan la linealidad del método [33].

Tabla 5. Resultados obtenidos para la linealidad según la prueba *t* de Student (nivel de confianza del 95%)

	Pendiente (b)	Intercepto (a)	Coefficiente de correlación (r)
Hipótesis	H ₀ : $\beta = 0$ H ₁ : $\beta \neq 0$	H ₀ : $\alpha = 0,015$ H ₁ : $\alpha \neq 0,015$	H ₀ : no hay correlación H ₁ : hay correlación
Confianza	0,95	0,95	0,95
Resultados	$t_{b_{exp}} = 86,6$ $t_{b_{tabla}} = 2,08$	$t_{a_{exp}} = 1,23$ $t_{a_{tabla}} = 2,08$	$t_{r_{exp}} = 119$ $t_{r_{tabla}} = 2,08$
Criterio de decisión	Rechazar H ₀	No rechazar H ₀	Rechazar H ₀

Límite de detección y de cuantificación

La medida de la absorbancia del blanco con siete réplicas presentó una respuesta de $0,015 \pm 0,005$. Con base en lo anterior, y empleando la curva de calibración, se encontró para el AG un límite de detección de 0,34 mg/L y un límite de cuantificación de 0,42 mg/L.

Precisión: repetibilidad

En la tabla 6 se presentan los resultados obtenidos para el factor de respuesta, medidos en los límites superior e inferior, y en el punto medio del rango. El método es preciso al nivel de la repetibilidad, dado que el coeficiente de variación procedente de todos los puntos es inferior al 2% [27].

Tabla 6. Factores de respuesta obtenidos en el ensayo de repetibilidad

	Límite inferior	Punto medio	Límite superior	
Día 1	0,0920	0,0899	0,0896	
Día 2	0,0931	0,0900	0,0883	
Día 3	0,0899	0,0901	0,0887	
Día 4	0,0939	0,0893	0,0881	
Día 5	0,0925	0,0907	0,0903	
Día 6	0,0900	0,0890	0,0905	
Día 7	0,0939	0,0892	0,0877	Total
Promedio	0,0922	0,0898	0,0890	0,0903
σ	0,0017	0,0006	0,0011	0,0018
C.V.	1,80%	0,66%	1,24%	1,98%

Exactitud

En la tabla 7 se muestran los resultados obtenidos para el recobro del AG en el proceso de extracción y de cuantificación de polifenoles totales con el reactivo de F-C. En general, se encontraron porcentajes de recuperación superiores al 97%.

Tabla 7. Porcentajes de recuperación obtenidos en el ensayo de exactitud

Sistema solvente	mg AG/g Fs "sin AG"	mg AG/g Fs "con AG"	mg AG recuperados	% recuperación
EtOH 0%	$31,6 \pm 0,4$	$104,8 \pm 1,0$	$29,3 \pm 0,4$	$97,5 \pm 1,4$
EtOH 40%	$42,3 \pm 0,4$	$115,9 \pm 1,3$	$29,5 \pm 0,5$	$98,2 \pm 1,8$
EtOH 80%	$38,0 \pm 0,4$	$111,4 \pm 1,2$	$29,4 \pm 0,5$	$97,9 \pm 1,7$

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos para la selectividad, linealidad, repetibilidad y exactitud demuestran que la metodología propuesta es confiable, a un nivel del 95%, para cuantificar polifenoles totales del fruto *Vaccinium meridionale* con el reactivo de Folin–Ciocalteu. De esta manera, puede ser empleada para evaluar la influencia de las condiciones de extracción asistidas por microondas, sobre la cantidad de polifenoles extraídos.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a la Universidad Tecnológica y Pedagógica de Colombia (UPTC) y a la Universidad de Boyacá (UB) por la disponibilidad de laboratorios, instrumentos y reactivos requeridos para la realización de este trabajo.

REFERENCIAS

1. R.L. Prior, X. Wu, K. Schaich, Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements, *J. Agric. Food Chem.*, **53**, 4290 (2005).
2. D. Huang, B. Ou, R.L. Prior, The chemistry behind antioxidant capacity assays, *J. Agric. Food Chem.*, **53**, 1841 (2005).
3. M.D. dos Santos, M.C. Almeida, N.P. Lopes, G.E. Petto, Evaluation of the anti-inflammatory, analgesic, and antipyretic activities of the natural polyphenol chlorogenic acid, *Biol. Pharm. Bull.*, **29**, 2236 (2006).
4. M. Kratchanova, P. Denev, M. Ciz, A. Lojek, A. Mihailov, Evaluation of antioxidant activity of medicinal plants containing polyphenol compounds. Comparison of two extraction systems, *Acta Biochim. Pol.*, **57**, 229 (2010).
5. N.C. Gordon, D.W. Wareham, Antimicrobial activity of the green tea polyphenol (–)-epigallocatechin-3-gallate (EGCG) against clinical isolates of *Stenotrophomonas maltophilia*, *Int. J. Antimicrob. Agents*, **36**, 129 (2010).
6. J.M. Leiro, M. Varela, M.C. Piazzon, J.A. Arranz, M. Noya, J. Lamas, The anti-inflammatory activity of the polyphenol resveratrol may be partially related to inhibition of tumour necrosis factor-alpha (TNF-alpha) pre-mRNA splicing, *Mol. Immunol.*, **47**, 1114 (2009).

7. R. China, S. Mukherjee, S. Sen, S. Bose, S. Datta, H. Koley, S. Ghosh, P. Dhar, Antimicrobial activity of *Sesbania grandiflora* flower polyphenol extracts on some pathogenic bacteria and growth stimulatory effect on the probiotic organism *Lactobacillus acidophilus*, *Microbiol. Res.*, **167**, 500 (2012).
8. A. Grigore, S. Colceru-Mihul, S. Litescu, M. Panteli, I. Rasit, Correlation between polyphenol content and anti-inflammatory activity of *Verbascum phlomoides* (mullein), *Pharm. Biol.*, **51**, 925 (2013).
9. L.Y. Chen, C.W. Cheng, J.Y. Liang, Effect of esterification condensation on the Folin–Ciocalteu method for the quantitative measurement of total phenols, *Food Chem.*, **170**, 10 (2015).
10. C. Proestos, M. Komaitis, Application of microwave-assisted extraction to the fast extraction of plant phenolic compounds, *LWT – Food Sci. Technol.*, **41**, 652 (2008).
11. L. Zhang, Y. Wang, D. Wu, M. Xu, J. Chen, Microwave-assisted extraction of polyphenols from *Camellia oleifera* fruit hull, *Molecules*, **16**, 4428 (2011).
12. S. Jokić, M. Cvjetko, D. Bozic, S. Fabek, N. Toth, J. Vorkapic-Furac, I.R. Redonnikov, Optimisation of microwave-assisted extraction of phenolic compounds from broccoli and its antioxidant activity, *Int. J. Food Sci. Tech.*, **47**, 2613 (2012).
13. L.J. Cseke, A. Kirakosyan, P.B. Kaufman, S.L. Warber, J.A. Duke, H.L. Brielmann, “Natural Products from Plants”, CRC Press, Boca Ratón, 2006, p. 528.
14. I.A.L. Persson, K. Persson, R.G.G. Andersson, Effect of *Vaccinium myrtillus* and its polyphenols on angiotensin-converting enzyme activity in human endothelial cells, *J. Agric. Food Chem.*, **57**, 4626 (2009).
15. G.A. Garzón, C.E. Narváez, K.M. Riedl, S.J. Schwartzb, Chemical composition, anthocyanins, non-anthocyanin phenolics and antioxidant activity of wild bilberry (*Vaccinium meridionale* Swartz) from Colombia, *Food Chem.*, **122**, 980 (2010).
16. M. Kondo, S.L. MacKinnon, C.C. Craft, M.D. Matchett, R.A. Hurta, C.C. Neto, Ursolic acid and its esters: occurrence in cranberries and other *Vaccinium* fruit and effects on matrix metalloproteinase activity in DU145 prostate tumor cells, *J. Sci. Food Agric.*, **91**, 789 (2011).
17. J. Ferrier, S. Djefal, H.P. Morgan, S.P.V. Kloet, S. Redžić, A. Cuerrier, M.J. Balick, J.T. Arnason, Antiglycation activity of *Vaccinium* spp. (*Ericaceae*) from

- the Sam Vander Kloet collection for the treatment of type II diabetes, *Botany*, **90**, 401 (2012).
18. C. Gaviria, C. Ochoa, N. Sánchez, C. Medina, M. Lobo, P. Galeano, A. Mosquera, A. Tamayo, Y. Lopera, B. Rojano, Actividad antioxidante e inhibición de la peroxidación lipídica de extractos de frutos de mortiño (*Vaccinium meridionale* SW), *Bol. Latinoamer. Caribe Plant. Med. Aromát.*, **8**, 519 (2009).
 19. Y.E. Lopera, J. Fantinelli, L.F. González, B. Rojano, J.L. Ríos, G. Schinella, S. Mosca, Antioxidant activity and cardioprotective effect of a nonalcoholic extract of *Vaccinium meridionale* Swartz during ischemia-reperfusion in rats, *Evid.-Based Complement. Alternat. Med.*, **2013**, ID 516727 (2013).
 20. M.E. Maldonado, S.S. Arango, B.A. Rojano, Free radical scavenging capacity and cytotoxic and antiproliferative effects of *Vaccinium meridionale* Sw. against colon cancer cell lines, *Rev. Cubana Plant. Med.*, **19**, 172 (2014).
 21. E. Karimi, H.Z.E. Jaafar, HPLC and GC-MS determination of bioactive compounds in microwave obtained extracts of three varieties of *Labisia pumila* Benth., *Molecules*, **16**, 6791 (2011).
 22. A. Fernández-Agulló, E. Pereira, M.S. Freire, P. Valentão, P.B. Andrade, J. González-Álvarez, J.A. Pereira, Influence of solvent on the antioxidant and antimicrobial properties of walnut (*Juglans regia* L.) green husk extracts, *Ind. Crop. Prod.*, **42**, 122 (2013).
 23. P. Garcia, A. Morales, A. Segura, A. Fernández, Phenolic-compound-extraction systems for fruit and vegetable samples, *Molecules*, **15**, 8813 (2010).
 24. A. Khoddami, M.A. Wilkes, T.H. Roberts, Techniques for analysis of plant phenolic compounds, *Molecules*, **18**, 2328 (2013).
 25. E. Karacabey, G. Mazza, Optimisation of antioxidant activity of grape cane extracts using response surface methodology, *Food Chem.*, **119**, 343 (2010).
 26. K.N. Prasad, F.A. Hassan, B. Yang, K.W. Kong, R.N. Ramanan, A. Azlan, A. Ismail, Response surface optimisation for the extraction of phenolic compounds and antioxidant capacities of underutilised *Mangifera pajang* Kosterm. peels, *Food Chem.*, **128**, 1121 (2011).
 27. P. Bruce, P. Minkkinen, M.L. Riekkola, Practical method validation: Validation sufficient for an analysis method, *Mikrochim. Acta*, **128**, 93 (1998).

28. A. Blainski, G.C. Lopes, J.C. Palazzo de Mello, Application and analysis of the Folin Ciocalteu method for the determination of the total phenolic content from *Limonium Brasiliense L.*, *Molecules*, **18**, 6852 (2013).
29. ICH Harmonised Tripartite Guideline, ICHQ2(R), Validation of analytical-procedures: Text and methodology Q2(R1), International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for registration pharmaceuticals for human use, 1994, pp. 1-12.
30. F.T. Peters, O.H. Drummer, F. Musshoff, Validation of new methods, *Forensic Sci. Int.*, **165**, 216 (2007).
31. W.P. Silva, C.M.D.P. Silva, LAB Fit Curve Fitting Software (Nonlinear Regression and Treatment of Data Program) V 7.2.48 (1999-2011). URL: <http://www.labfit.net>, consultado en agosto de 2015.
32. J.N. Miller, J.C. Miller, "Estadística y quimiometría para química analítica", Prentice Hall, Madrid, 2002, pp. 97-98.
33. A. Álvarez, M. Trujillo, Desarrollo y validación de un método analítico indicativo de estabilidad por HPLC para la cuantificación de Rosuvastatina cálcica, *Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm.*, **43**, 69 (2014).

Adaptación y optimización de un método de lectura por fluorometría en el modelo farmacológico *in vitro* de cultivo de *Plasmodium falciparum*

María Helena Arias Marciales¹, Yinneth Victoria Rodríguez Novoa¹, Giovanny Garavito Cárdenas^{1*}.

¹ Universidad Nacional de Colombia, Sede Bogotá, Facultad de Ciencias, Departamento de Farmacia (DFUNC), Grupo de Investigación FaMeTra (Farmacología de la Medicina Tradicional y Popular), Carrera 30 N. ° 45-03, Bogotá D.C. Colombia.

* Correo electrónico: ggaravitoc@unal.edu.co

Recibido para evaluación: 13 de septiembre de 2015.

Aceptado para publicación: 16 de febrero de 2016.

RESUMEN

El modelo farmacológico de cultivo *in vitro* de *P. falciparum* es crucial en el tamizaje inicial de sustancias o extractos de plantas con posible actividad antiplasmodial. La densidad parasitaria puede determinarse mediante variadas metodologías, sin embargo, se han descrito numerosas ventajas y desventajas asociadas a cada una de ellas.

Se evaluaron el tiempo de incubación necesario para la tinción y el uso de cultivos asincrónicos o sincrónicos en busca de valores óptimos; evidenciando un tiempo óptimo de 2 h, y límites de detección y cuantificación, menores en cultivos asincrónicos. Empleando las cepas FCR3 y FCB2 se evidenció un ruido de fondo de 12% y 38% respectivamente; la linealidad mostró una buena correlación, r^2 de 0,9644 (FCR3) y 0,9841 (FCB2) y una pendiente de 1761,8 y 852,4 respectivamente. Además, se comprobó había concordancia entre los métodos, fluorométrico con SYBR Green I (SYBRG I) y microscópico con Giemsa, con diferencia media de 0,00002% y 0,09109% para FCR3 y FCB2 respectivamente. Los límites de detección y cuantificación fueron 0,5% y 1,5% de parasitemia. El factor Z con FCB2 fue 0,376, en tanto que con FCR3 alcanzó 0,702. La concentración inhibitoria 50 (CI₅₀) frente a *P. falciparum* FCR3, generada por cloroquina (CQ) fue 0,37 mcg/mL por microscopía y 0,35 mcg/mL por fluorometría.

Nuestros hallazgos sugieren que el ensayo de fluorescencia con SYBRG I, empleando fluorómetros comúnmente disponibles en muchos laboratorios, es preciso, robusto, rápido y exacto; para la evaluación *in vitro* de sustancias o extractos con posible actividad antiplasmodial.

Palabras clave: Antimalaricos, *Plasmodium falciparum*, Sybr Green I, espectrometría de fluorescencia.

SUMMARY

Adaptation and optimization of a fluorometric reading method, in the *in vitro* pharmacological model of *Plasmodium falciparum* culture

The *in vitro* pharmacological model of *P. falciparum* culture is crucial in the initial screening for substances or plant extracts with possible antiplasmodial activity. The parasite density can be determined by varied methods, however have been described numerous advantages and disadvantages associated with each of them.

The incubation time required for staining and the use of synchronous or asynchronous cultures were assessed for optimal settings; showing optimal time of 2 h, and lower limits of detection and quantification in asynchronous cultures. Employing the FCB2 and FCR3 strains, was evidenced a background noise of 12% and 38% respectively; linearity showed a good correlation, r^2 of 0.9644 (FCR3) and 0.9841 (FCB2) and a slope of 1761.8 and 852.4, respectively. It was evidenced agreement between the methods, fluorometric with SYBR Green I (SYBRG I) and microscopic with Giemsa, the mean difference was 0.00002% and 0.09109% respectively for FCR3 and FCB2, The limits of detection and quantification were 0.5% and 1.5% of parasitaemia. The Z factor was 0.376 with FCB2, whereas with FCR3 reached 0.702. The inhibitory concentration 50 (IC_{50}) against *P. falciparum* FCR3, generated by chloroquine (CQ), was 0.37 mcg/mL by microscopy and 0.35 mcg/mL by fluorometry.

Our findings suggest that the SYBRG I fluorescence based assay, by using fluorometers commonly available in many laboratories, is precise, robust, fast and accurate; for the *in vitro* evaluation of substances or extracts with possible antiplasmodial activity.

Keywords: Antimalarials, *Plasmodium falciparum*, Sybr Green I, fluorescence spectrometry.

INTRODUCCIÓN

Desde que Trager y Jensen [1] describieron un protocolo para el cultivo *in vitro* de las etapas eritrocíticas de *P. falciparum*, y Desjardins [2] propuso su semi-automatización y miniaturización para lograr el crecimiento en placas de microtitulación, el modelo farmacológico *in vitro* de cultivo de *P. falciparum* se ha mantenido a la cabeza como técnica de tamizaje primario en la investigación de nuevas alternativas terapéuticas, y el estudio de combinaciones de fármacos frente a la malaria. Este modelo permite emplear el mismo agente que parasita al hombre, además, es relativamente rápido y accesible a muchos laboratorios y no tiene las restricciones éticas que acompañen el trabajo en los modelos de animal integro. Sin embargo, presenta limitaciones de bioseguridad derivadas del empleo de un agente infeccioso que requiere para su crecimiento eritrocitos y plasma humanos.

El modelo requiere de un método de cuantificación de parasitemia asequible y confiable; el método más ampliamente utilizado para evaluar la sensibilidad del parásito a los medicamentos se basa en el examen microscópico de frotis de sangre teñidos con Giemsa, que permite además del conteo de los glóbulos rojos parasitados, la identificación de la morfología del microorganismo; sin embargo, es engorroso, requiere frotis de buena calidad y tiene implícito un sesgo subjetivo (pueden encontrarse diferencias significativas en la parasitemia estimada por diferentes microscopistas); adicionalmente, se han descrito resultados falsos positivos y negativos de más de 36% y 18%, respectivamente, haciéndolo inconveniente para la cuantificación rápida en el tamizaje primario de posibles candidatos a fármacos [3-6].

Otros métodos comúnmente empleados para determinar la densidad parasitaria son: el método de incorporación de la hipoxantina tritiada (“estándar de oro”); los ensayos de ELISA, que usan anticuerpos monoclonales de *Plasmodium spp.*, lactato deshidrogenasa pLDH y HRPII. Si bien estos métodos son precisos y fáciles de usar tienen como inconveniente la realización de un protocolo de múltiples pasos y su elevado costo los hace poco útiles para su uso rutinario [4-5].

Desde el 2004, numerosos autores han reportado el uso de sondas fluorescentes para la determinación del crecimiento y la propagación de *Plasmodium*, pero se ha generado controversia sobre la capacidad del método para medir la susceptibilidad *in vitro* en muestras en sangre entera, dado que estos métodos se basan en la detección de ADN parasitario en glóbulos rojos infectados y los colorantes empleados no son específicos para el ADN de *Plasmodium*; por ejemplo, SYBRG I se une a cualquier ADN de doble cadena, resultando en un considerable ruido de fondo cuando se utiliza en presencia de otras células propias de la sangre entera [5, 7].

En la evaluación comparativa de los métodos SYBRG I y HRP-2 ELISA, para medir la susceptibilidad *in vitro* de las cepas de *P. falciparum* de referencia, se encontró similitudes en el límite de detección de muestras en sangre entera y las tradicionales muestras del cultivo; la sensibilidad del ensayo SYBRG I fue menor en muestras enriquecidas con sangre entera (mayor fluorescencia de fondo y aumento en la variabilidad de los resultados), probablemente como consecuencia de la unión de SYBRG I al ADN de otras células presentes en la sangre completa, resultando esto particularmente problemático en cultivos de referencia de baja parasitemia (<1,0%) o muestras clínicas frescas de <0,2% de parasitemia; situaciones no comunes en el modelo farmacológico empleado en el tamizaje primario de actividad antiparasitaria [8, 9]).

El método de cuantificación de parasitemia debe ajustarse y responder a las necesidades propias del modelo farmacológico específico en que va a ser empleado; en el caso del tamizaje de actividad antiparasitaria de sustancias o extractos de origen vegetal, el porcentaje de parasitemia empleado típicamente corresponde a niveles más altos que hacen pertinente y conveniente el empleo del método en estas particulares condiciones.

Las evaluaciones reportadas sobre el uso de sondas fluorescentes en citometría de flujo para determinar la parasitemia y las concentraciones inhibitorias 50 (IC₅₀) de sustancias antimaláricas, empleando colorantes de ácidos nucleicos tales como YOYO-1®, naranja de acridina, yoduro de propidio y SYTO-16®, requieren la disponibilidad de un citómetro y de personal técnico altamente especializado para mantenerlo operativo, los cuales no siempre están disponibles en todos los laboratorios [3, 10]. La cuantificación fluorométrica de ADN parasitario es simple, sensible y suficientemente específica, porque el SYBRG I es un colorante de cianina que se une con alta afección al ADN de doble hélice de los parásitos, y puede ser excitado a 488 nm usando un láser de luz visible comúnmente disponible en varios fluorómetros comerciales.

Un estudio que comparó muestras de sangre hemolizada y no hemolizada mostró que para la sangre no hemolizada hay una mayor relación señal-ruido y un manejo más práctico; la concentración de fluorocromo óptima para que SYBRG I discrimine los glóbulos rojos parasitados (GRP) fue establecida en 4X, y respecto al pH óptimo para la tinción se reportaron resultados similares a pH neutro (7,4) y a pH básico (8,8), sin afectar el tiempo de tinción [10].

Trabajos previos hacen evidente la necesidad de conocer las capacidades y optimizar el método de fluorescencia, como una prioridad para asegurar la calidad de los resultados generados; el método de lectura debe ser conocido no sólo en cuanto a su rango y linealidad, sino que debe ser optimizado para mayor eficiencia, capacidad de detección, velocidad y bajo consumo de reactivos [11, 12]. Algunos indicadores de las capacidades

del método se pueden utilizar como medidas para la evaluación de robustez frente a cambios en la metodología o para determinar las condiciones metodológicas óptimas para la cuantificación.

Reportes previos relacionados con evaluación fluorométrica mediante citometría de flujo, en modelos *in vitro* de actividad frente a Plasmodium y Babesia, sugieren que el método fluorométrico podría ser adaptado a la lectura en un fluorómetro común [11].

METODOLOGÍA

Reactivos

SYBRG I a concentración 10.000X en DMSO, para tinción de ácidos nucleicos y qPCR, fue adquirido a INVITROGEN®, se preparó solución madre en DMSO a concentración 100X que se almacenó a -20°C protegida de la luz y se descongeló inmediatamente antes de su uso. El tampón de lisis consiste en una solución de Tris (20 mM), EDTA (5 mM), saponina (0,008% [p/v]) y Triton X-100 (0,08% [v/v]), el cual se preparó previamente, se ajustó a pH 7,5 y se almacenó a 4°C . Cloroquina difosfato se adquirió a Sigma y se preparó una solución madre a 10 mM. Las cepas FCB2 y FCR3 de *P. falciparum* se obtuvieron del Instituto Nacional de Salud y de la Universidad de Antioquía; los glóbulos rojos humanos y el suero fueron gentilmente donados por Hemocentro Distrital de Bogotá D.C.

Modelo farmacológico de cultivo de P. falciparum

Las cepas se mantuvieron en cultivo continuo en el laboratorio de acuerdo con la técnica descrita por Trager y Jensen [1]. Los glóbulos rojos parasitados (GRP) se cultivaron en frascos de 25 mL (Corning Costar Corporation®, EE.UU.), que contenían 8,5 mL de medio RPMI 1640, 0,7 mL de suero humano, 0,1 mL L-glutamina y 400 mL de sangre parasitada (hematocrito = 2%). La parasitemia se mantuvo entre 0,7 y 3% (alrededor de 2%). Los ajustes se hicieron con glóbulos rojos sanos (GRS). Los cultivos se incubaron a 37°C en atmósfera 5% de CO_2 , y una humedad de alrededor del 90%. El medio fue renovado todos los días y se llevó a cabo un control microscópico (100X) de la parasitemia mediante la realización de un frotis de sangre fijado con metanol, y coloreado con Giemsa [13-18]. La sincronización del cultivo se hizo con sorbitol 5%.

Recuento de parasitemia por el método basado en fluorescencia

En general, en un tubo falcon® de 15 mL se adicionó 30 μL de GRP más 1.470 μL de PBS (hematocito del 2%); posteriormente, se realizaron diluciones seriadas tomando

735 μL de la muestra inicial que se adicionaron a un nuevo falcon[®] conteniendo 15 μL GRS y 735 μL de PBS, este procedimiento se realizó cuantas veces fue necesario hasta lograr una parasitemia de 0,01%. Al finalizar las diluciones seriadas de parasitemia, 100 μL de cada suspensión de células se transfirieron a una microplaca de 96 pozos por quintuplicado, se adicionó 100 μL de solución de SYBRG I/tampón de lisis a concentración 2X y la placa se incubó a 37 °C en la oscuridad.

Concentración Inhibitoria 50 (CI₅₀) de Cloroquina (CQ)

A partir de una solución madre de CQ en RPMI de 1.000 mcg/mL se realizaron diluciones hasta obtener las siguientes concentraciones en placa 1; 0,5; 0,25; 0,125; 0,063 y 0,031 mcg/mL; a una parasitemia de 2% y hematocrito 2,5%. Se incubó por 48 h a 37 °C y 5% de CO₂, luego se valoraron las parasitemias correspondientes a cada dilución por microscopía y por fluorometría y se determinó la CI₅₀ mediante modelo de regresión.

Optimización del método

Ensayos preliminares nos permitieron establecer la concentración de fluorocromo en (2X) SYBR I/PBS; una vez adaptado el método a nuestras condiciones se procedió a su optimización; el tiempo de incubación con SYBRG I y el efecto de trabajar con cultivos sincrónicos o asincrónicos fueron las variables estudiadas para establecer sus condiciones óptimas buscando velocidad, eficiencia y bajo consumo de reactivos. El efecto de eventos aleatorios como diferentes días y analistas, en la precisión del procedimiento analítico fue estudiado a lo largo del rango del ensayo. La robustez y la calidad del ensayo (factor Z) fueron examinadas.

Estudio de las capacidades del método

Para estudiar el comportamiento de la fluorescencia generada en unidades de fluorescencia relativa (UFR) por diferentes porcentajes de parasitemia, GRP infectados por *P. falciparum* se diluyeron en serie con GRS o en cultivo fueron sometidos a diferentes concentraciones de cloroquina, con el fin de ajustar las parasitemias en un rango aproximado entre 0,01-5,00% para la cepa FCB2 y 0,3-10,0% para la cepa FCR3. GRS fueron empleados como control negativo (C-). En cada pozo de una placa de 96 pozos fueron adicionados 100 μL de solución colorante (2X) SYBRG I/PBS a 100 μL de cada dilución de GRP, en quintuplicado y se incubó la placa en la oscuridad a temperatura ambiente durante 2 h. Posteriormente, se determinaron los valores de fluorescencia, utilizando un lector de placas (Twinkle LB 90. BERTHOLD_Technologies[®]) a 485 nm y 535 nm, longitudes de onda de excitación y emisión respectivamente.

Las UFR, después de la sustracción del ruido de fondo (UFR de GRS) y los porcentajes de parasitemia, fueron graficadas y analizadas por regresión lineal. Un extendido de

cultivo se coloreó con Giemsa para comprobar la parasitemia por microscopía. Todas las determinaciones se realizaron en quintuplicado en tres muestras procesadas independientemente. La variabilidad se calculó como la desviación estándar. El límite de detección y el límite de cuantificación se calcularon basándose en la desviación estándar del blanco (C-) y la pendiente según lo indicado por las guías de la conferencia internacional de armonización [13, 16], mediante las ecuaciones:

$$LD = 3,3 \sigma / S \quad \text{y} \quad LC = 10 \sigma / S$$

Donde 3,3 es el valor t de Student para un nivel de confianza de 95%, σ es la desviación estándar del blanco y S es la pendiente de la curva de calibración [13].

Determinación de la calidad del método (Factor Z)

Zhang *et al.* [12] reportaron una prueba estadística útil para determinar la calidad de los ensayos: el factor Z, el cual se calcula de la siguiente manera:

$$Z = 1 - [(3\sigma(C+) + 3\sigma(C-)) / (\mu(C+) - \mu(C-))]$$

Donde μ y σ son la media y la desviación estándar del control correspondiente (control positivo (C+) o (C-) referido al ruido de fondo) y el denominador corresponde al valor absoluto de la diferencia en las medias de los controles positivo y negativo.

RESULTADOS Y DISCUSION

Adaptación y optimización del método fluorométrico

La revisión de los hallazgos publicados previamente alrededor de esta metodología llevo a seleccionar el fluorocromo, su concentración y el pH, se realizaron algunos ensayos preliminares que fijaron (2X) SYBRG I/tampón de lisis.

El tiempo de incubación con SYBRG I, para lograr la tinción con la mejor respuesta fluorescente, fue sometido a optimización a los niveles de variable 5 y 30 min; 1, 2, 4, 6, 24 y 48 h; empleando como indicadores de desempeño los parámetros de la metodología. Las curvas de concentración parasitaria *vs* respuesta fluorescente evidencian que en general se mantiene la linealidad y la proporcionalidad en los diferentes tiempos de tinción evaluados, sin embargo, los tiempos de tinción de 24 y 48 h generan curvas diferentes, en las cuales parece perderse un poco la proporcionalidad en la respuesta ante diferentes niveles de concentración parasitaria.

La pendiente promedio de las curvas generadas, en los diferentes tiempos de incubación, muestra una marcada disminución después de las 6 h, la variabilidad en los datos

es más alta en los tiempos de tinción de 5 y 30 min; frente a la pendiente generada, el tiempo de tinción es robusto entre 1 y 6 h (ver figura 1(A)). El coeficiente de correlación promedio de las curvas, en los diferentes tiempos de tinción, evidencia una marcada disminución después de las 6 h, con una alta variabilidad a las 24 h; frente al coeficiente de correlación el tiempo de tinción es robusto entre 5 min y 6 h (ver figura 1(B)).

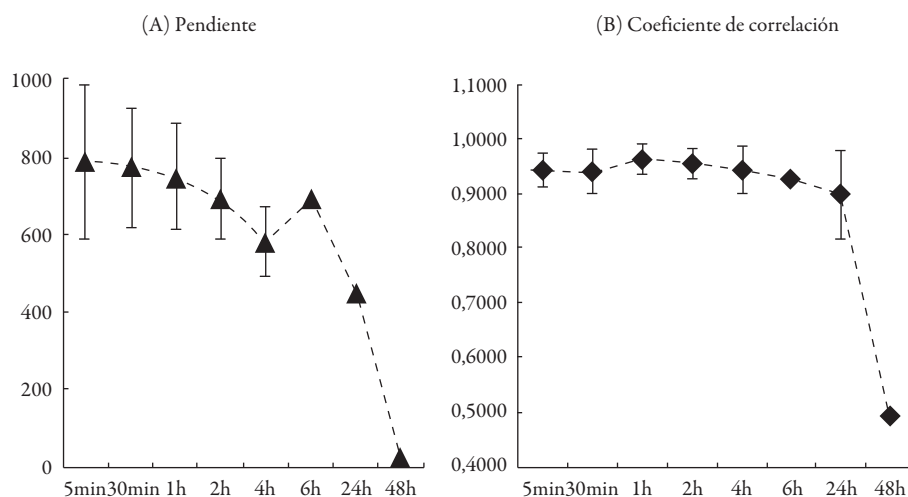


Figura 1. Optimización del tiempo de tinción, pendiente (A) y coeficiente de correlación (B), cepa FCB2. (Todas las mediciones se realizaron en quintuplicado, se presentan resultados de tres muestras procesadas de forma independiente, los valores de 6 h y 48 h provienen de un solo ensayo. Cada valor es procesado mediante sustracción de la fluorescencia de fondo).

Los límites promedio de detección y de cuantificación presentaron alta variabilidad a los 5 min; se mantuvieron relativamente constantes entre 1 y 6 h y posterior a ello se presenta aumento en la variabilidad y en los valores promedio de estos indicadores, a la luz de ello el tiempo de tinción es robusto entre 1 y 4 h (ver figura 2).

El promedio de concentración parasitaria mínima a la cual se logra calcular factor Z se mantiene relativamente constante entre 1 y 4 h; en cuanto al factor Z el tiempo de tinción es robusto entre 1 y 4 h (ver figura 3).

En general el tiempo de incubación es robusto entre 1 y 4 h; por razones de velocidad y eficiencia se determina un tiempo óptimo de tinción de 2 h.

El efecto de trabajar con cultivos sincrónicos o asincrónicos fue evaluado para establecer sus condiciones óptimas. En cultivo sincrónico es evidente que a bajas concentraciones

parasitarias la fluorescencia generada por el C- tiende a ser superior a la de las muestras, generando valores inferiores a cero (al ser sustraída la fluorescencia del ruido de fondo), situación que no se presenta en el cultivo asincrónico donde se logra acreditar fluorescencia en bajas concentraciones parasitarias.

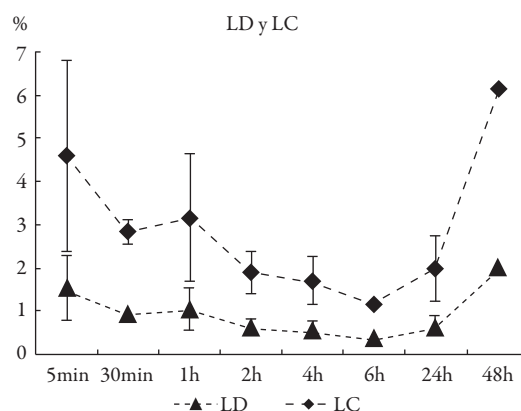


Figura 2. Optimización del tiempo de tinción, límite de detección (LD) y límite de cuantificación (LQ), cepa FCB2. (Todas las mediciones se realizaron en quintuplicado, se presentan resultados de tres muestras procesadas de forma independiente, los valores de 6 h y 48 h provienen de un solo ensayo. Cada valor es procesado mediante sustracción de la fluorescencia de fondo).

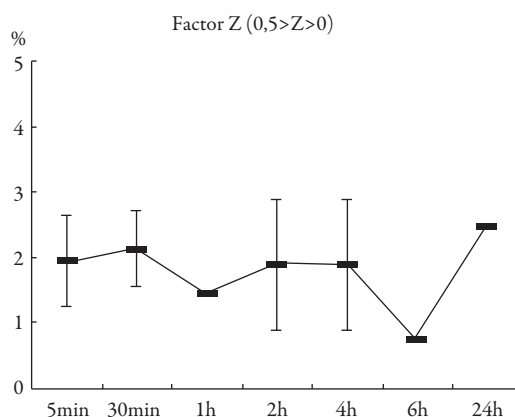


Figura 3. Optimización del tiempo de tinción, concentración parasitaria mínima a la que se logra calcular el factor Z, cepa FCB2. (Todas las mediciones se realizaron en quintuplicado, se presentan resultados de tres muestras procesadas de forma independiente, los valores de 1 h y 6 h provienen de un solo ensayo. Cada valor es procesado mediante sustracción de la fluorescencia de fondo).

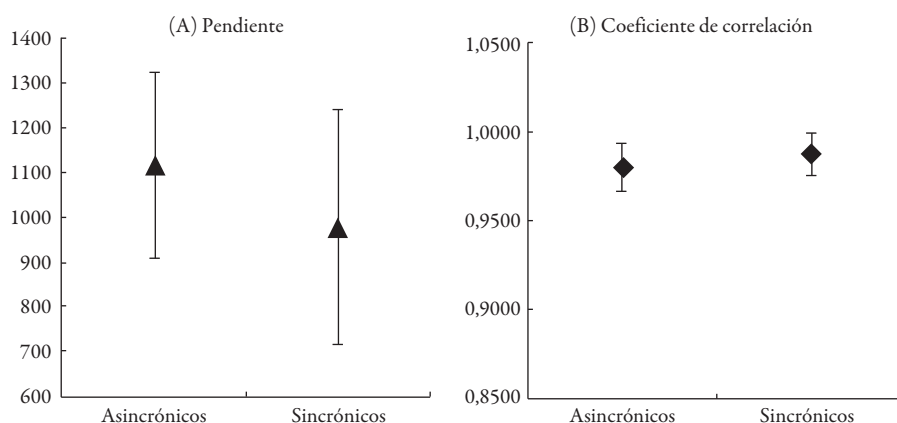


Figura 4. Optimización del tipo de cultivo asincrónico o sincrónico, pendiente (A) y coeficiente de correlación (B), cepa FCB2. (Todas las mediciones se realizaron en quintuplicado, se presentan resultados de tres muestras procesadas de forma independiente. Cada valor es procesado mediante sustracción de la fluorescencia de fondo).

En cuanto a la pendiente y el coeficiente de correlación no son evidentes diferencias derivadas del uso de cultivos sincrónicos o asincrónicos (ver figura 4). Los límites de detección y de cuantificación son significativamente inferiores cuando se emplea un cultivo asincrónico, frente a los encontrados con un cultivo sincrónico; confirmando que en el cultivo sincrónico, a bajas concentraciones parasitarias, la fluorescencia generada por el C- tiende a ser superior a la de las muestras, como se comentó anteriormente (ver figura 5).

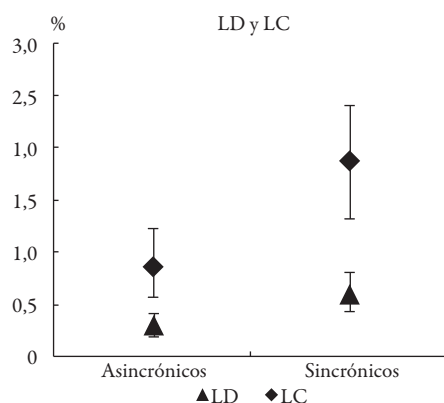


Figura 5. Optimización del tipo de cultivo asincrónico o sincrónico, límite de detección (LD) y límite de cuantificación (LC), cepa FCB2. (Todas las mediciones se realizaron en quintuplicado, se presentan resultados de tres muestras procesadas de forma independiente. Cada valor es procesado mediante sustracción de la fluorescencia de fondo).

Aun cuando es viable trabajar con un cultivo sincrónico, el cultivo asincrónico presenta mayor sensibilidad siendo esta la condición óptima de desarrollo del método. La sincronía es el comportamiento biológico normal de *P. falciparum* en el hospedero humano, in vitro generalmente, la sincronización ayuda a una mejor valoración microscópica del parásito en estadio de anillos al final del ensayo de actividad antiplasmodial (48 h después del inicio del tratamiento), el método fluorométrico permitiría superar esta limitante.

Parámetros de la metodología

La fluorescencia generada por los GRS al contacto con el SYBRG I es estable como ruido de fondo; bajo condiciones optimizadas, el control positivo (GRP) generó en promedio una respuesta de 14.920 ± 1.735 UFR y 4.918 ± 570 UFR, en tanto que el control negativo (GRS) en promedio presentó una fluorescencia de 1.792 ± 377 UFR y 1.876 ± 217 UFR, cepas FCR3 y FCB2 respectivamente. En relación a la señal generada por el control C+, los GRS originan una lectura de fluorometría que corresponde al 12% (95% CI: 11-13%, n = 9) y 38% (95% CI: 36-41%, n = 10), cepas FCR3 y FCB2 respectivamente; la lectura significativamente superior del C-, en el caso de la cepa FCB2, derivó de un comportamiento atípico del lote específico de material biológico, posiblemente, esto fue consecuencia del alto número de repiques consecutivos, dicho comportamiento fue también evidente en controles del ensayo de actividad antiplasmodial (parasitemia de grupo testigo y grupo control) (ver figura 6).

Linealidad de la respuesta fluorescente generada por SYBR Green I

Para evaluar la linealidad entre el porcentaje de parasitemia y la correspondiente respuesta fluorescente generada, los resultados se representan gráficamente y se analizan por regresión, encontrándose una correlación lineal positiva y proporcional. La pendiente promedio de las líneas de regresión generadas fue $1.761,8 \pm 238,5$ y $852,4 \pm 227,0$; con coeficientes de correlación (r^2) promedio de $0,9644 \pm 0,0169$ y $0,9841 \pm 0,0049$, cepas FCR3 y FCB2 respectivamente (ver figura 7).

El método tiene una adecuada relación linear entre la densidad parasitaria y la respuesta en UFR a lo largo del rango de concentraciones parasitarias cuantificadas en el modelo farmacológico.

Exactitud del método fluorescente por SYBR Green I

En los modelos biológicos, la calibración con cantidades conocidas del “analito” es difícil o imposible, por lo que los verdaderos valores permanecen desconocidos, entonces, un nuevo método debe evaluarse por comparación con un método establecido en lugar de hacerlo frente a la cantidad verdadera; si el nuevo método concuerda bien con el antiguo, este último puede ser remplazado; el método de fluorescencia, en comparación

con el recuento microscópico de extendidos de sangre teñidos con Giemsa, se evaluó en muestras de eritrocitos procedentes del cultivo de *P. falciparum*, sometidas al procedimiento de marcaje con SYBRG I o tinción de Giemsa y procesadas mediante lectura de fluorescencia o valoración microscópica de la parasitemia. Se desarrolló un análisis bajo el proceso propuesto por Bland y Altman [14, 15]. Los resultados evidencian concordancia entre los dos métodos con una diferencia media de 0,00002% y 0,09109%, cepas FCR3 y FCB2 respectivamente (ver figura 8).

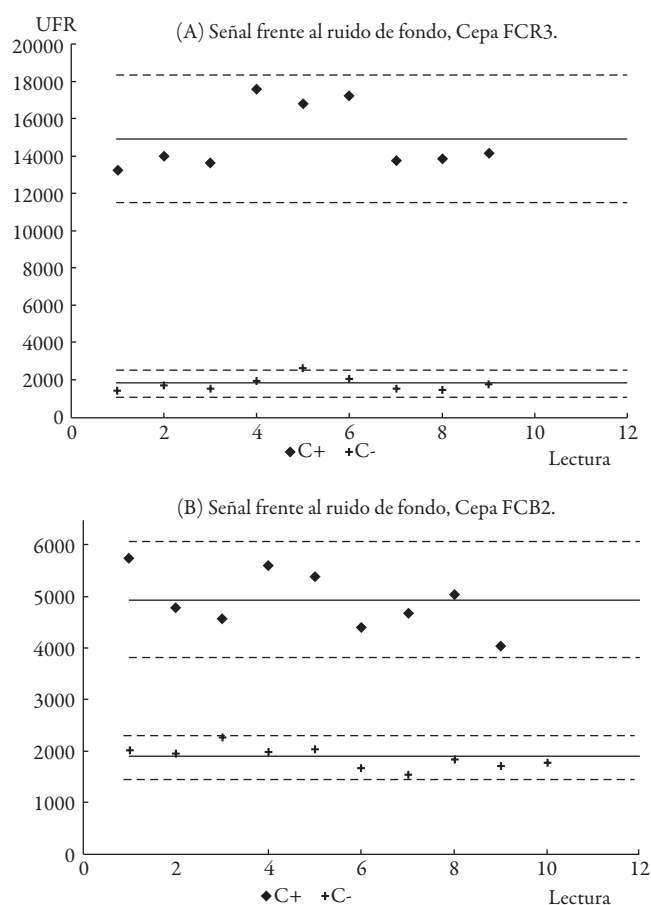


Figura 6. Respuesta fluorescente generada por los controles positivo (C+) y negativo (C-) en el método de fluorescencia SYBRG I, bajo condiciones optimizadas. (Las líneas horizontales continuas representan el promedio de respuesta, las líneas punteadas delimitan el intervalo de confianza del 95% de cada conjunto de datos). UFR (unidades de fluorescencia relativa), C+ (control positivo), C- (ruido de fondo, glóbulos rojos no parasitados).

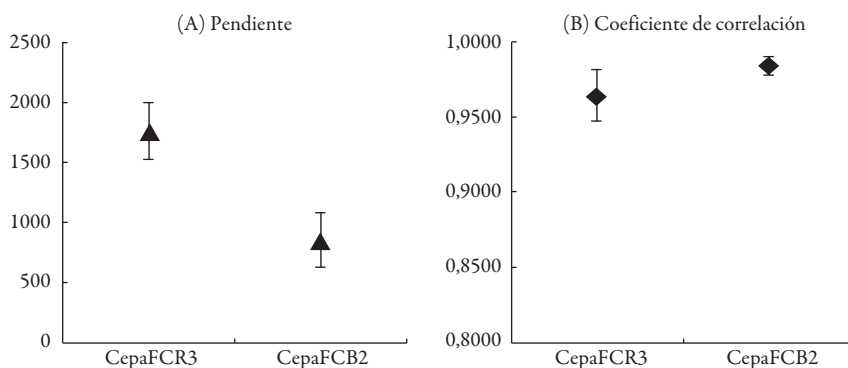


Figura 7. Evaluación de la linealidad entre la respuesta fluorescente (UFR) y el porcentaje de parasitemia; pendiente (A) y coeficiente de correlación r^2 (B). (Todas las mediciones se realizaron en quintuplicado, se presentan resultados de hasta tres muestras procesadas de forma independiente. Cada valor es procesado mediante sustracción de la fluorescencia de fondo).

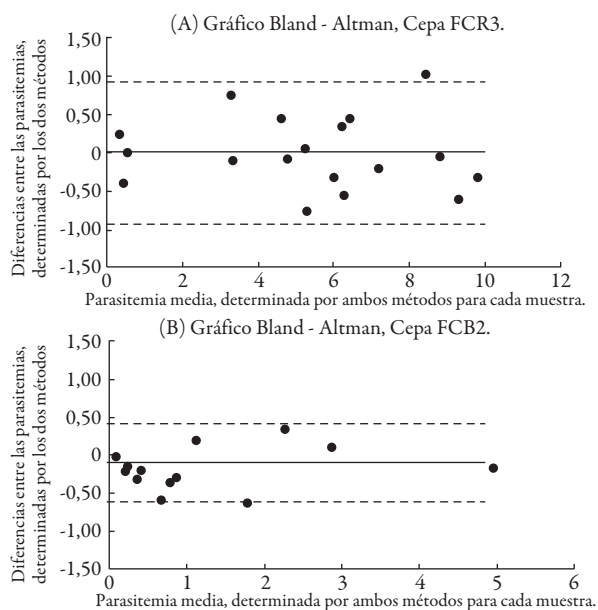


Figura 8. Representación gráfica de la diferencia entre el método de fluorescencia SYBRG I y el método de extendidos de sangre coloreados con Giemsa, frente a sus valores medios. (Muestras de cultivo de *P. falciparum* marcadas con SYBRG I o coloreadas con Giemsa y determinada su parasitemia. Los datos se trazan para evaluar la concordancia entre los dos métodos de tinción. La línea continua indica la diferencia de medias entre los dos métodos. Las líneas punteadas indican los límites superiores e inferiores de concordancia, confianza del 95%).

El rango depende de la aplicación prevista del método, siendo el intervalo de concentraciones parasitarias en el cual el método proporciona un grado aceptable de linealidad, exactitud y precisión [13]. Los dos métodos fueron comparados a lo largo del rango de valores de parasitemia que se encuentran típicamente en el modelo farmacológico, cuando es empleado en el tamizaje *in vitro* de sustancias o extractos con posible actividad antiplasmodial (1-10% cepa FCR3 y 0,5-5%, cepa FCB2), buscando conocer qué correspondencias hay entre los dos métodos de valoración de parasitemia. En el diseño experimental de este modelo farmacológico, las diferencias de parasitemia entre el control negativo (vehículo de los tratamientos) y el grupo tratado, normalmente deben ser mayores de 50% para poder clasificar como activo un tratamiento; luego, aun si los dos métodos muestran lecturas que difieren hasta en un 0,5% de parasitemia, podríamos reemplazarlos entre sí dado que esta diferencia no afectaría a las decisiones sobre tamizaje de actividad. En cada ensayo, el grupo control positivo monitorea internamente la prueba.

A la luz de lo anterior, nuestro estudio muestra (con una confianza del 95%) que el ensayo de fluorescencia con SYBRG I arroja resultados tan solo 0,93% (FCR3) o 0,60% (FCB2) por debajo o por encima de los arrojados por el método microscópico con Giemsa, es plausible el uso del nuevo método para los fines de tamizaje *in vitro* de actividad antiplasmodial. Las gráficas generadas no muestran tendencia direccional o heterocedasticidad.

Sensibilidad del método fluorescente con SYBR Green I

La sensibilidad fue valorada mediante la determinación del límite de detección (LD) y el límite de cuantificación (LC), entendiéndose el primero como el más bajo porcentaje de parasitemia que genera una señal fluorescente significativamente diferente de la generada por el control negativo (C-), y el segundo como el más bajo porcentaje de parasitemia que se puede cuantificar con exactitud y precisión aceptables [16] (ver figura 9(A)).

El límite de detección del método es $0,3 \pm 0,01\%$ (FCR3) y $0,5 \pm 0,2\%$ (FCB2), y el límite de cuantificación $0,8 \pm 0,04\%$ (FCR3) y $1,5 \pm 0,5\%$ (FCB2); en ambas cepas el LD es significativamente inferior al LC (95%confianza).

Calidad del método (Factor Z).

El factor Z es un parámetro estadístico que representa la separación de las distribuciones generadas por las señales de los controles positivo y negativo [12]. Los modelos farmacológicos que muestran un factor $Z \geq 0,5$ denotan un método excelente; un factor Z entre 0,5 y cero indica un método bueno o de doble respuesta; estos valores del factor Z se consideran adecuados para cribado de alto rendimiento (HTS) [19]. En condiciones optimizadas, el factor Z logró alcanzar valores superiores a 0,5

($0,702 \pm 0,142$) para la cepa FCR3 y entre 0,5 y 0,0 ($0,376 \pm 0,009$) para la cepa FCB2, a una parasitemia promedio de $3,5 \pm 0,3\%$ y $1,6 \pm 1,2\%$ respectivamente (ver figura 9(B)).

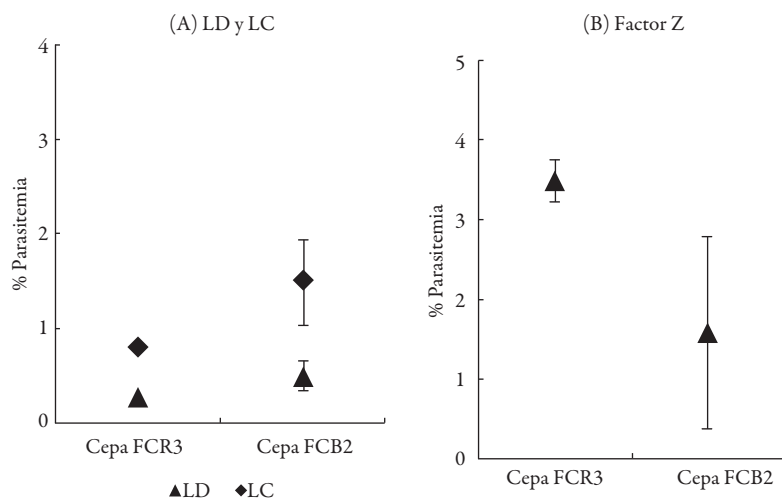


Figura 9. Evaluación de la sensibilidad y calidad del método fluorométrico con SYBRG I; (A) límite de detección (LD) y límite de cuantificación (LC), (B) porcentaje mínimo de parasitemia para el factor Z. (Todas las mediciones se realizaron en quintuplicado, se presentan resultados de hasta tres muestras procesadas de forma independiente).

El presente estudio reporta la adaptación y optimización de un método alternativo (empleando un equipo accesible en muchos laboratorios), basado en fluorescencia y adecuado a las condiciones específicas de tamizaje de actividad antiplasmodial, es decir, en muestras de cultivo con parasitemias significativas ($>1\%$), en las cuales el efecto de un tratamiento activo debe reflejar una reducción significativa ($>50\%$) de la señal (respecto al grupo control vehículo de tratamientos) y con bajo consumo de reactivos. Se estudió la robustez frente al tiempo de tinción evidenciando que no se presentan diferencias importantes en los parámetros del método entre 1 y 4 h, desde 6 h los valores de estos indicadores comienzan a cambiar, y la variabilidad en su determinación aumenta. En nuestras condiciones demostramos que es adecuada la tinción con SYBRG I a (2X), en cultivos asincrónicos y con un tiempo de tinción óptimo de 2 h.

Frente a los parámetros del método Vossen *et al.* [8] se encontró un bajo ruido de fondo del 13,92% generado por RPMI frente al agua destilada; cuando se mezcló SYBRG I con medio RPMI se obtuvo un ruido de fondo estable e independientemente de aditivos; así mismo muestras con eritrocitos no infectados presentaron un ruido de

fondo inferior que el RPMI, probablemente derivado de la amortiguación de la señal producida por la hemoglobina. En nuestras manos bajo condiciones óptimas, el ruido de fondo generado por el C- (GRS) frente al C+ fue de 12% y 38% para las cepas FCR3 y FCB2. Bajo condiciones optimizadas se verificó la linealidad de fluorescencia del SYBRG I sobre un rango de parasitemia conocida (determinada mediante examen microscópico), en una gama que enmarca los niveles de parasitemia generalmente empleados en el modelo farmacológico.

Para escoger el método de cuantificación de parasitemia que pueda ser empleado en un modelo farmacológico, se debe tener en cuenta las particularidades de la prueba; según lo demostrado por Moneriz *et al.* [16], que el cálculo de concentración inhibitoria 50 (CI₅₀) no se ve afectado por la elección del colorante fluorescente de ADN, la presencia de la hemoglobina o de detergentes de lisis en la muestra, sugiriendo que en estos modelos farmacológicos para estimación de la CI₅₀, la baja sensibilidad no es asunto crítico. Recientemente, varios autores informaron la utilidad del ensayo SYBRG I para valorar la sensibilidad de *P. falciparum* (aislados de campo de África y del Sudeste de Asia) a los medicamentos, evidenciando que el método basado en fluorescencia genera resultados de CI₅₀ comparables a los generados por los métodos tradicionales de incorporación de [3H]-hipoxantina o HRP-2 ELISA [6, 9, 19-21].

Los métodos micro-fluorométricos de alta sensibilidad son críticos en aplicaciones como el control de las infecciones submicroscópicas en las primeras etapas de la enfermedad o en el embarazo y en la estimación de la eficiencia de las vacunas; por ejemplo, para muestras clínicas no aclaradas de glóbulos blancos, el método HRP-2 ELISA ha demostrado ser superior al método SYBRG I, en la evaluación de campo de aislamientos frescos de *P. falciparum* con baja parasitemia (<0,2%), como los generalmente encontrados en el Sudeste asiático [9].

Para el tamizaje *in vitro* de agentes anti-babesia, en cultivos de *Babesia bovis*, el método basado en la fluorescencia de SYBRG I fue evaluado frente a la valoración microscópica clásica; los valores obtenidos de concentración inhibitoria (IC₅₀) de 5 fármacos mostraron concordancia [11]. Igualmente, Somsak *et al.* [10] demostraron que la CI₅₀ de pirimetamina y CQ, determinados fluorométricamente por citometría de flujo y por microscopía, fueron comparables confirmando la aplicabilidad del método de marcaje con SYBRG I en el tamizaje rutinario de fármacos. En nuestras manos la CI₅₀ de Cloroquina sobre la cepa FCR3 fue $0,37 \pm 0,05$ mcg/mL ($0,72 \pm 0,09$ μ M) determinada por microscopía, y $0,35 \pm 0,02$ mcg/mL ($0,68 \pm 0,03$ μ M) determinada por fluorometría (ver figura 11); estos valores son comparables con lo reportado por otros autores [22-25].

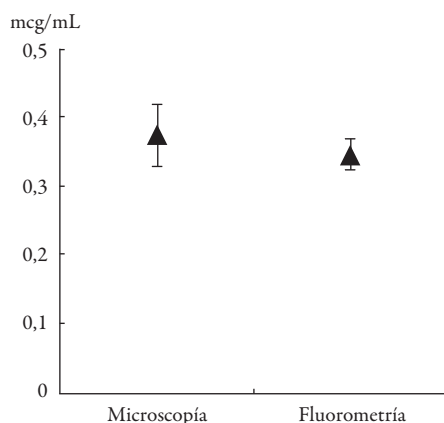


Figura 10. Concentración Inhibitoria 50 de Cloroquina valorada por los métodos microscópico y fluorométrico con SYBRG I. (Todas las mediciones se realizaron en triplicado, se presentan resultados de tres muestras procesadas de forma independiente).

Algunas desventajas asociadas con la cuantificación por microscopía de la parasitemia de *P. falciparum* pueden ser superadas por el método de fluorescencia SYBRG I. Por ejemplo, los resultados basados en microscopía pueden ser inconsistentes porque la exactitud de los valores de parasitemia quizá sean influenciados subjetivamente por las personas que hacen la determinación; por el contrario, los valores de fluorescencia siguen siendo los mismos a pesar de ser medidos por diferentes investigadores.

En conclusión, el presente trabajo ha adaptado y optimizado un método, alternativo a la citometría de flujo que empleando fluorómetros comunmente disponibles en muchos laboratorios es preciso, robusto, accesible y rápido para el tamizaje de sustancias o extractos en el modelo farmacológico de cultivo de *P. falciparum*. Las condiciones óptimas para el desarrollo de la valoración mediante fluorescencia con SYBRG I son: cultivos asincrónicos y 2 h de tiempo de tinción; bajo estas condiciones de ensayo, se detecta con precisión la parasitemia por encima de 1,5%, y se presenta alta concordancia con la microscopía en la determinación de concentraciones inhibitorias 50.

AGRADECIMIENTOS

M.H. Arias recibió apoyo financiero de Colciencias y el MAE francés a través del programa ECOSNORD, así como de la Vicedecanatura de Investigación, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia. Se agradece al Hemocentro Distrital de Bogotá D.C., al Instituto Nacional de Salud y a la Universidad de Antioquia por

el apoyo brindado con material biológico. El presente trabajo se adelantó dentro de las actividades del grupo de investigación: Farmacología de la Medicina Tradicional y Popular (FaMeTra), del Departamento de Farmacia, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia.

REFERENCIAS

1. W. Trager, J.B. Jensen, Human malaria in continuous culture, *Science*, **193**, 673-675 (1976).
2. R.E. Desjardins, C.J. Canfield, J.D. Haynes, J.D. Chulay, Quantitative assessment of antimalarial activity *in vitro* by a semiautomated microdilution technique, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **16**(6), 710-718 (1979).
3. L.J.J.W. Smeijsters, N.M. Zijlstra, F.F.J. Franssen, J.P. Overdulve, Simple, fast, and accurate fluorometric method to determine drug susceptibility of *Plasmodium falciparum* in 24-well suspension cultures, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **40**(4), 835-838 (1996).
4. T.N. Bennett, M. Paguio, B. Gligorijevic, C. Seudieu, A.D. Kosar, E. Davidson *et al.*, Novel, rapid, and inexpensive cell-based efficacy quantification of antimalarial drug, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **48**(5), 1807-1810 (2004).
5. B.T. Grimberg, Methodology and application of flow cytometry for investigation of human malaria parasites, *J. Immunol. Methods*, **367**(1-2), 1-16 (2011).
6. D.J. Bacon, C. Latour, C. Lucas, O. Colina, P. Ringwald, S. Picot, Comparison of a SYBR green I-based assay with a histidine-rich protein II enzyme-linked immunosorbent assay for *in vitro* antimalarial drug efficacy testing and application to clinical isolates, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **51**(4), 1172-1178 (2007).
7. M. Smilkstein, N. Sriwilaijaroen, J.X. Kelly, P. Wilairat, M. Riscoe, Simple and inexpensive fluorescence-based technique for high-throughput antimalarial drug screening, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **48**(5), 1803-1806 (2004).
8. M.G. Vossen, S. Pferschy, P. Chiba, H. Noedl, The SYBR green I malaria drug sensitivity assay: performance in low parasitemia samples, *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **82**, 398-401 (2010).
9. S. Chaorattanakawee, S.D. Tyner, C. Lon, K. Yingyuen, W. Ruttvisutinunt, S. Sundrakes, P. Saignam, J.D. Johnson, D.S. Walsh, D.L. Saunders, C.A. Lanteri,

- Direct comparison of the histidine-rich protein-2 enzyme-linked immunosorbent assay (HRP-2 ELISA) and malaria SYBR green I fluorescence (MSF) drug sensitivity tests in *Plasmodium falciparum* reference clones and fresh *ex vivo* field isolates from Cambodia, *Malar. J.*, **12**, 239 p. 1-11 (2013).
10. V. Somsak, S. Srichairatanakool, Y. Yuthavong, S. Kamchonwongpaisan, Ch. Uthaipibull, Flow cytometric enumeration of *Plasmodium berghei*-infected red blood cells stained with SYBR Green I, *Acta Tropica*, **122**, 113-118 (2012).
11. A. Guswanto, T. Sivakumar, M.A. Rizk, S.A.E. El sayed, M.A. Youssef, E.E.S. El Said, N. Yokoyama, I. Igarashi, Evaluation of a fluorescence-based method for antibabesial drug screening, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **58**(8), 4713-4717 (2014).
12. J.H. Zhang, T.D.Y. Chung, K.R. Oldenburg, A simple statistical parameter for use in evaluation and validation of high throughput screening assays, *J. Biomol. Screen.*, **4**(2), 67-73 (1999).
13. The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products, International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, "Harmonised Tripartite Guideline: Validation of Analytical Procedures: Methodology", CPM/ICH/281/95, 1996, pp. 1-9.
14. J.M. Bland, D.G. Altman, Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement, *Lancet*, **1**, 307-310 (1986).
15. J.M. Bland, D.G. Altman, Measuring agreement in method comparison studies, *Stat. Methods Med. Res.*, **8**, 135-160 (1999).
16. C. Moneriz, P. Marín-García, J.M. Bautista, A. Diez, A. Puyet, Haemoglobin interference and increased sensitivity of fluorimetric assays for quantification of low-parasitaemia *Plasmodium* infected erythrocytes, *Malar. J.*, **8**, 279 p. 1-10 (2009).
17. E. Deharo, P. Gautret, V. Muñoz, M. Sauvain, "Técnicas de laboratorio para la selección de sustancias antimaláricas", CYTED-IRD, La Paz, Bolivia, 2000.
18. G. Garavito, "Etude pharmacologique expérimentale de l'activité antipaludique d'un composé de synthèse: le chlorure de methylthioninium", These Docteur, Université Toulouse III, 2007. URL: <http://tel.archives-ouvertes.fr/tel-00639025/fr/>, 2007.

19. J.D. Johnson, R.A. Dennull, L. Gerena, M. Lopez-Sanchez, N.E. Roncal, N.C. Waters, Assessment and continued validation of the malaria SYBR green I-based fluorescence assay for use in malaria drug screening, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **51**(6), 1926-1933 (2007).
20. H.M. Akala, F.L. Eyase, A.C. Cheruiyot, A.A. Omondi, B.R. Ogutu, N.C. Waters, J.D. Johnson, M.E. Polhemus, D.C. Schnabel, D.S. Walsh, Antimalarial drug sensitivity profile of western Kenya *Plasmodium falciparum* field isolates determined by a SYBR green I *in vitro* assay and molecular analysis, *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **85**, 34-41 (2011).
21. M.A. Rason, T. Randrianntsoa, H. Andrianantenaina, A. Ratsimbaoa, D. Menard, Performance and reliability of the SYBR green I based assay for the routine monitoring of susceptibility of *Plasmodium falciparum* clinical isolates, *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, **102**, 346-351 (2008).
22. L. Guetzoyan, F. Ramiandrasoa, H. Dorizon, C. Desprez, A. Bridoux, A. Rogier, *In vitro* efficiency of new acridyl derivatives against *Plasmodium falciparum*, *Bioorg. Med. Chem.*, **15**, 3278-3289 (2007).
23. B. Pradines, S. Alibert-Franco, C. Houdoin, J. Mosnier, C. Santelli-Rouvier, V. Papa, *In vitro* reversal of chloroquine resistance in *Plasmodium falciparum* with dihydroethanoanthracene derivatives, *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **66**(6), 661-666 (2002).
24. C. Molyneaux, M. Krugliak, H. Ginsburg, K. Chibale, Arylpiperazines displaying preferential potency against chloroquine-resistant strains of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*, *Biochem. Pharmacol.*, **71**, 61-68 (2005).
25. A. Mendoza, S. Pérez-Silanes, M. Quiliano, A. Pabón, S. Galiano, G. González, G. Garavito, M. Zimic, A. Vaisberg, I. Aldana, A. Monge, E. Deharo, Aryl piperazine and pyrrolidine as antimalarial agents. Synthesis and investigation of structure–activity relationships, *Exp. Parasitol.*, **128**(2), 97-103 (2011).

Nanopartículas lipídicas a base de propóleos como transportadores de activos de interés cosmético: Desarrollo, caracterización y evaluación de seguridad

Yuly X. Correa González¹, Daniela Paillíé Jiménez¹, Alba L. Valenzuela Correa², Maritza A. Rojas Cardozo³, Claudia E. Mora Huertas^{1*}

¹ Universidad Nacional de Colombia, Sede Bogotá, Facultad de Ciencias, Departamento de Farmacia, Grupo de investigación en Desarrollo y Calidad de Productos Farmacéuticos y Cosméticos, Ciudad Universitaria, Carrera 30 N. ° 45-03, edificio 450, código postal 111321, Bogotá D.C., Colombia.

* Correo electrónico: cemorah@unal.edu.co, tel.: +5713165000 ext.14625; fax: +5713165060

² Centro de Innovación y Desarrollo Tecnológico de Belcorp, Tocancipá, Colombia.

³ Universidad Nacional de Colombia, Sede Bogotá, Facultad de Ciencias, Departamento de Farmacia, Grupo de Investigación en Fitoquímica y Farmacognosia UN (GIFFUN), Ciudad Universitaria, Carrera 30 N. ° 45-03, edificio 450, código postal 111321, Bogotá D. C., Colombia.

Recibido para evaluación: 21 de diciembre de 2015.

Aceptado para publicación: 24 de febrero de 2016.

RESUMEN

En el ámbito cosmético, la tecnología a escala nanométrica resulta atractiva para el diseño de productos novedosos y funcionales. Así, para el caso de las nanopartículas lipídicas, se ha demostrado su capacidad para incrementar la estabilidad de moléculas activas y modificar su liberación. Como un aporte en la búsqueda de alternativas innovadoras para la preparación de este tipo de transportadores (*carriers*), el presente trabajo propone el aprovechamiento de las ceras provenientes de propóleos para la preparación de partículas lipídicas conteniendo extracto del árbol de té. Las partículas obtenidas presentan tamaños cercanos a 200 nm con polidispersidades inferiores a 0,1. Los valores de potencial zeta cercanos a cero sugieren un mecanismo de estabilización del sistema particulado vía efecto estérico. De otro lado, la incorporación del activo dentro de la estructura de las partículas es confirmada por DSC. En conjunto, los resultados evidencian la posibilidad de generar valor agregado a un producto de la colmena reconocido y valorado por sus propiedades biológicas. Además, ofrecen un material de partida que constituye una alternativa interesante

para el desarrollo de productos cosméticos novedosos en los que podrían incorporarse moléculas activas.

Palabras claves: Emulsificación-difusión, nanopartículas sólidas lipídicas, propóleos, aceite del árbol de té.

SUMMARY

Propolis based lipid nanoparticles as carriers of cosmetic actives: Development, characterization and safety evaluation

In the cosmetic field, the technology at the nanometric scale is attractive for designing novel and functional products. In the case of lipid nanoparticles, the ability of these carriers for increasing the stability of active molecules and modifying their release has been demonstrated. As a contribution in the research of innovative alternatives for preparing these particles, this work proposes the use of the propolis waxes as starting material. In this way, lipid nanoparticles containing tea tree oil were prepared having particle sizes close to 200 nm with polydispersity indexes less than 0.1. The zeta potential values near to zero suggest the stabilization of the lipid nanoparticles via steric mechanisms. The incorporation of the active into the nanoparticle structure is confirmed by DSC. As a whole, the results are appealing in order to give added value to beehive product, recognized in Latin America for its biological properties. Furthermore, these results offer a new alternative of lipid material which is interesting for developing pioneering cosmetic products containing active molecules.

Keywords: Emulsification-diffusion, Solid lipid nanoparticles, Propolis, Tea tree oil.

INTRODUCCIÓN

En el ámbito cosmético, la nanotecnología se ha convertido en uno de los ejes de innovación gracias al diseño de materiales a escala nanométrica que aprovechan desde modificaciones físicas, que permiten lograr efectos de color, hasta modificaciones químicas que mejoran la solubilidad de algunos compuestos o disminuyen su reactividad [1, 2]. Dentro de dichos materiales se encuentran las partículas lipídicas, objeto de estudio en la presente investigación, debido a su potencial para la encapsulación de sustancias susceptibles de degradación [3], la liberación controlada de moléculas [4] y la ventaja que ofrecen respecto a la penetración de compuestos activos en el estrato córneo de la piel [5].

Además, por sus propiedades oclusivas contribuyen a la hidratación de la piel [6], y por su tamaño y estructura, podrían emplearse como sistema alternativo de protección UV [7].

Las partículas lipídicas son derivadas de las emulsiones. No obstante, las gotas lipídicas son sólidas a temperatura corporal y, según los materiales de partida, pueden clasificarse como nanopartículas sólidas lipídicas (SLN, por sus siglas en inglés) o como transportadores lipídicos nanoestructurados (NLC, por sus siglas en inglés). Para su preparación se emplean técnicas como la emulsificación-difusión [8] utilizando lípidos sólidos y líquidos, tensioactivos y solventes [9]. Sobre esta base, el presente trabajo busca el aprovechamiento de estos componentes en la preparación de partículas lipídicas considerando que el propóleo contiene sustancias lipídicas (e.g., ceras) y que es catalogado como de uso alimentario y GRAS (Generally Recognized as Safe) [10]. Así, se pretende proponer un nuevo material para ser usado en formulaciones cosméticas y plantear una alternativa novedosa de utilización del propóleo, que genere valor agregado a las ceras que contiene y que son catalogadas como contaminantes que afectan desfavorablemente su calidad.

METODOLOGÍA

Materiales

El propóleo empleado en la presente investigación fue gentilmente donado por el Jardín Botánico de Medellín, siendo recolectado entre noviembre de 2014 y febrero de 2015 en la ciudad de Medellín (Antioquia, Colombia; 6° 13' 55" 098N, 75° 34' 05" 752W, altitud 1486 m.s.n.m.), en colmenas de abejas sin aguijón de la especie nativa *Tetragonisca angustula*. También fueron utilizados triglicéridos cáprico/caprílico (CCT, Labrafac Lipophile WL 1349, obsequiado por Gattefossé), aceite del árbol de té (TTO, *Melaleuca alternifolia*, Lipovol® Tea Tree, obsequiado por Lipo® Colombia Ltda), aceite de ajonjolí calidad farmacéutica, poloxamer 188 (PLX, Kolliphor® P188, Basf; obsequiado por Handler Colombia), alcohol polivinílico (PVA) 31-51 kDa y 87-89% de hidrólisis, adquirido en Sigma-Aldrich, acetato de etilo (AcOEt)(R.A. Tedia®), n-hexano (R.A. J.T. Baker), medio Eagle modificado por Dulbecco (Sigma Aldrich), suero fetal bovino (Eurobia) y penicilina y estreptomycin (*Life Sciences*). El agua destilada usada en todos los experimentos se obtuvo a partir del sistema Milli-Q.

Métodos

Control de calidad del propóleo, extracción y caracterización del material lipídico extraído

Teniendo en cuenta que en Colombia no se dispone de una normativa para el control de calidad del propóleo, en el presente estudio se estructuró una ficha de control de

calidad a partir de las legislaciones argentina [11] y brasilera [12, 13] para establecer los valores de especificación. Los métodos utilizados fueron los oficiales de la *Association of Analytical Communities* (AOAC, 2012), la farmacopea americana [14] y Standard Methods [15]; así como aquellos reportados en la literatura [16-20]. Para la extracción del material lipídico se investigaron los métodos Soxhlet, Goldfish y Randall (Unidad Extractora de Solventes Ser 148 VelpScientifica); para los dos primeros se usó como disolvente n-hexano, mientras que para la extracción por el método Randall se utilizaron n-hexano y AcOEt (ver tabla 1). El material lipídico extraído fue caracterizado por cromatografía en capa delgada (TLC), espectroscopía infrarroja (IR, IRAffinity-1 FT-IR Shimadzu), calorimetría diferencial de barrido (DSC, DSC 1 STAR^e System-Mettler Toledo) y difracción de rayos X (XRD, X'PertPRO PANalytical).

Tabla 1. Métodos de extracción evaluados

Método	Tipo de extracción	Cantidad de material de partida (g)	Duración de la extracción (hora)
Soxhlet	Semicontinua	2-3	4
Goldfish	Continua	2	4
Randall	Continua acelerada por inmersión	3	1

Preparación y caracterización de partículas lipídicas empleando material lipídico del propóleo

Para la preparación de las partículas lipídicas se utilizó el método de emulsificación-difusión propuesto por Quintanar *et al.* con algunas modificaciones [8]. En síntesis, se dispersaron 100 mg del material lipídico extraído del propóleo en 10 mL de solvente orgánico (AcOEt) previamente saturado con agua (Ika[®] C-Mag HS 7; 500 rpm, temperatura ambiente). Dicha dispersión, denominada fase orgánica, se filtró a través de papel de filtro Whatman N. ° 3, se adicionó al agente estabilizante previamente disuelto en 40 mL de agua saturada con AcOEt (fase acuosa) y se emulsificó (Ultraturax[®] T18 IKA[®]; 11200 rpm, 5 min). La emulsión obtenida se adicionó bajo agitación (Ika[®] C-Mag HS 7, 500 rpm) a 250 mL de agua destilada. Las partículas lipídicas se formaron inmediatamente. Finalmente, el AcOEt y parte del agua fueron retirados por evaporación a presión reducida (Heidolph Hei-VAP Precision; 130 rpm, 40 °C). Las condiciones más adecuadas para lograr el menor tamaño de partícula, la menor polidispersidad y el mayor porcentaje de área de la señal principal, fueron deducidas por medio de un diseño experimental del tipo Plackett-Burman para 12 experimentos (Statgraphics Centurion V17.1.02), donde se investigaron los efectos a dos niveles del agente estabilizante (PVA o PLX), de otros lípidos adicionados (CCT o aceite de ajonjolí), y del tiempo y la velocidad de emulsificación (ver tabla 2).

Tabla 2. Factores evaluados mediante diseño experimental Plackett-Burman para deducir la formulación de partículas lipídicas a base de cera de propóleos

Factor	Nivel inferior (-1)	Nivel superior (+1)
PVA	2,5 %	5,0 %
PLX	2,5 %	5,0 %
CCT	0 mg	10 mg
Aceite de ajonjolí	0 mg	10 mg
Tiempo de emulsificación	5 min	10 min
Velocidad de emulsificación	11200 rpm	15600 rpm

Finalmente, las partículas lipídicas obtenidas a partir de las condiciones más adecuadas fueron caracterizadas respecto a su tamaño e índice de polidispersidad por el método de dispersión de luz dinámica (Zetasizer Nano ZS, Malvern®, 5 mediciones por muestra, 5 barridos por medición, con una duración de 10 s por barrido a una temperatura de 25 °C y un ángulo de 173°). El potencial zeta fue determinado mediante velocimetría Doppler de láser empleando el mismo equipo. Para tal fin, se preparó una dispersión diluida de partículas en NaCl 1 mM, realizando 5 mediciones por muestra, 10 barridos por medición, con una duración de 10 s por barrido, a una temperatura de 25 °C.

Igualmente, se evaluó la estabilidad a temperatura ambiente (18 °C \pm 3 °C) y en estufa a 40 °C \pm 1 °C (Jouan IG150), de la dispersión acuosa de las nanopartículas durante 45 días, haciendo lecturas de tamaño y potencial zeta cada 15 días \pm 1 día. Adicionalmente, a través de una metodología modificada a partir del trabajo de Avgoustakis *et al.* [21], se evaluó la estabilidad coloidal de las partículas lipídicas frente a la presencia de electrolitos. Para este ensayo de agregación inducida con sulfato de sodio, se tomaron 250 μ L de dispersión de partículas y se adicionaron sobre 2,5 mL de soluciones de sulfato de sodio de concentraciones diferentes desde 0 M a 1 M, incubadas a 37 °C en un baño maría bajo agitación constante (100 rpm; plancha de calentamiento Ika® C-Mag HS, 2102). Transcurridos 10 min se determinó visualmente la concentración crítica de coagulación.

Para lograr una aproximación a la composición química de las partículas se identificaron los principales grupos funcionales utilizando TLC y espectroscopía infrarrojo (IR, IRAffinity-1 FT-IR Shimadzu).

Evaluación de la citotoxicidad in vitro de las partículas lipídicas

La citotoxicidad de las dispersiones de partículas preparadas a partir del material extraído del propóleos fue evaluada a través de ensayos *in vitro* en líneas celulares de fibroblastos y queratinocitos.

Citotoxicidad en fibroblastos 3T3/Balb-c medida a través de la captación del colorante rojo neutro

Se utilizaron células en fase exponencial de crecimiento, cultivadas en el laboratorio y sembradas en placas de 96 pozos en una densidad de $1,5 \times 10^4$ células/pozo, con medio de cultivo suplementado (DMEM, medio Eagle modificado por Dulbecco + 5 % suero fetal bovino y 1 % antibiótico penicilina/estreptomicina). Las células se adhirieron durante $20 \text{ h} \pm 4 \text{ h}$ y se reemplazó su medio de cultivo. Posteriormente, se adicionaron los tratamientos de forma directa sobre las células en concentraciones de 2000 ppm a 50 ppm y se incubaron en condiciones estándar de cultivo (37°C , 65 % de humedad relativa, 5 % de CO_2). Tras $24 \text{ h} \pm 2 \text{ h}$ de incubación, las células se observaron por microscopía invertida para evaluar los posibles daños o cambios en la morfología celular. Se retiraron los tratamientos y se adicionó colorante rojo neutro (NR). Las células fueron incubadas nuevamente durante $3 \text{ h} \pm 0,5 \text{ h}$ bajo las condiciones previamente expuestas y al cabo de ese tiempo se lavaron, se extrajo el NR de las células tratadas y se cuantificó espectrofotométricamente a 550 nm.

A partir de las absorbancias obtenidas se calculó el porcentaje de supervivencia celular de las células tratadas *versus* el control de crecimiento (blanco sin tratamiento). Para obtener los valores de las concentraciones efectivas EC_{90} (relacionada con la potencia de actividad) y EC_{50} (que define el grado de actividad sobre el sistema celular en estudio) se realizó un análisis de regresión no lineal del porcentaje de supervivencia versus el logaritmo de la concentración en estudio. El grado de irritación se asignó según los criterios presentados en la tabla 3. La máxima dosis tolerada (HTD) es un parámetro determinado a través de observación microscópica, que representa la concentración que causa solamente los mínimos cambios morfológicos comparados con los cultivos control [22–24].

Tabla 3. Clasificación general de los irritantes para la prueba de captación de rojo neutro [24].

Valor EC_{90} (ppm)	Valor HTD (ppm)	Clasificación
> 500 ppm	> 200 ppm	Irritante mínimo
	< 200 ppm	
200 ppm - 500 ppm	> 100 ppm	Irritante ligero
	< 100 ppm	
100 ppm - 200 ppm	> 50 ppm	Irritante moderado
	< 50 ppm	
50 ppm - 100 ppm	> 25 ppm	
< 50 ppm	< 25 ppm	Irritante severo

HTD: Dosis máxima tolerada.

Citotoxicidad en líneas celulares establecidas de queratinocitos epidermales modificados humanos (HaCaT) usando MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol)

Se emplearon células en fase exponencial de crecimiento, obtenidas de los cultivos cotidianos del laboratorio y sembradas en placas de 96 pozos con una densidad de 5×10^3 células/pozo, con medio de cultivo suplementado (DMEM, medio Eagle modificado por Dulbecco + 10 % suero fetal bovino y 1 % antibiótico penicilina/estreptomicina). Los tratamientos fueron adicionados directamente sobre las células en concentraciones de 2000 ppm a 50 ppm y se incubaron en condiciones estándar de cultivo. Después de $24 \text{ h} \pm 2 \text{ h}$ de incubación los cultivos celulares se observaron por microscopía invertida para evaluar los posibles daños o cambios en la morfología celular. Los tratamientos fueron retirados, se adicionó colorante MTT y las células se incubaron durante $2 \text{ h} \pm 0,5 \text{ h}$, bajo las condiciones previamente expuestas. Se realizó la extracción de los cristales de formazán producidos en isopropanol, y se cuantificaron por espectrofotometría a 575 nm. Para obtener los valores EC_{90} y EC_{50} , las absorbancias obtenidas se relacionaron con los controles de crecimiento mediante análisis de regresión no lineal en una curva de supervivencia celular en porcentaje *versus* concentración.

Incorporación de aceite del árbol de té (TTO) en partículas lipídicas a base de material lipídico extraído de propóleos

Utilizando la formulación definida previamente para la preparación de las partículas lipídicas, se investigó su capacidad para incorporar TTO. Para tal fin, se evaluaron diferentes concentraciones de este activo, que se adicionó en la fase orgánica. Las partículas obtenidas fueron caracterizadas como se ha descrito y la presencia de activo fue detectada por TLC usando como fase estacionaria cromatofolios TLC Silica Gel 60 F₂₅₄ (Merck Millipore) y confirmada por IR.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Control de calidad del propóleos

El propóleos es una sustancia resinosa natural que las abejas fabrican principalmente a partir de los exudados de plantas, ceras y sustancias propias de su metabolismo con el fin de utilizarlo para construir y proteger la colmena [25–27]. Físicamente, se describe como un material lipofílico y duro que al ser calentado se hace suave, flexible y pegajoso. Tiene un olor característico y su color varía según su origen y antigüedad, desde amarillo o verde, hasta rojo o marrón [28].

Como se observa en la tabla 4, el propóleos empleado en la presente investigación no satisface todos los estándares de calidad definidos por las normativas de referencia.

Esto puede ser atribuido a su composición química, que depende de factores como el método de extracción, la época de recolección, la iluminación, la altitud, la especie de abejas, la diversidad vegetal circundante y las actividades paralelas de las zonas vecinas a la colmena [27]. En efecto, las legislaciones en este tema están basadas en el propóleo de cada región y muchos son obtenidos de colmenas de abejas de mayor difusión comercial, como es el caso de *Apis mellifera* L. [29].

No obstante, para este estudio son de particular interés los resultados obtenidos en los ensayos de componentes solubles en etanol y ceras. Los componentes solubles en etanol corresponden a la cantidad de resinas que recolectan las abejas de varias especies vegetales y que llevan a la colmena para elaborar el propóleo [33]. Así, a mayor contenido de resinas mayor actividad biológica, lo que a la vez guarda relación directa con los ensayos de cantidad de fenoles totales, contenido de flavonoides e índice de oxidación. De acuerdo con esto, al tener componentes solubles en etanol por debajo de la especificación, el propóleo utilizado en esta investigación es limitado respecto al contenido de sustancias activas.

De otro lado, respecto a las ceras, se espera una baja proporción debido a la ausencia de moléculas activas en ellas [20]. En efecto, un elevado contenido de ceras en el propóleo (> 40 %) se considera un criterio para su clasificación como material de baja calidad, lo cual es un inconveniente para la preparación de soluciones concentradas de propóleos [34, 35]. Como se observa en la tabla 4, el contenido de tales componentes en el propóleo bajo estudio es bastante elevado. Sin embargo, la presente investigación busca aprovechar esta aparente desventaja para darle un valor agregado y convertirlo en materia prima para la preparación de partículas lipídicas con aplicación en el campo cosmético.

Extracción y caracterización del material lipídico a partir del propóleo

Inicialmente, se investigó la extracción del material lipídico del propóleo empleando diferentes métodos y solventes (n-hexano y AcOEt). Como se observa en la tabla 1, se evaluaron tres métodos de extracción. Sin embargo, el método Soxhlet presentó inconvenientes de orden práctico debido a que el material lipídico se deposita en el brazo del sifón, dificultando la extracción, razón por la cual no fue posible alcanzar un valor confiable en la determinación y se descarta este método para la continuidad del trabajo. De los dos métodos continuos, el de Randall fue seleccionado porque si bien la eficiencia de extracción es algo menor (ver tabla 5), el tiempo de calentamiento del material es inferior al requerido por la técnica de Goldfish, lo que preserva la integridad del extracto. Al caracterizar por TLC los lípidos extraídos (ver figura 1) se detecta la presencia de compuestos de carácter terpénico o fenilpropanoide [36], los que según reportes previos pueden corresponder a monoterpenos que le dan el olor característico [37] y a derivados de los ácidos cinámico, benzoico y fenilpropanoico [38].

Tabla 4. Control de calidad del propóleos crudo del Jardín Botánico de Medellín

Ensayo	Método	Rango establecido como aceptable	Resultado
Olor	Organoléptico [30]	Característico: resinoso o balsámico ^{a,b}	Resinoso
Color	Organoléptico [30]	Amarillo, pardo, verdoso, rojizo, marrón y otros ^{a,b}	Marrón oscuro
Sabor	Organoléptico [30]	Característico: de suave balsámico a fuerte y picante ^{a,b}	Balsámico
Consistencia a temperatura ambiente	Organoléptico [30]	Maleable a rígido ^{a,b}	Rígido
Aspecto	Organoléptico [30]	Homogéneo o heterogéneo ^{a,b}	Heterogéneo
Pérdida por calentamiento o secado	Gravimétrico [31]	Máximo 8 % ^a ; máximo 10 % ^b	5,2 % ± 0,3 %
Cenizas	Gravimétrico [32]	Máximo 5 % ^{a,b}	1,2 % ± 0,3 %
Masa mecánica o cuerpos extraños	Gravimétrico; extracción con solventes [16]	Máximo 40 % ^a ; Máximo 25 % ^b	25,9 % ± 0,8 %
Ceras	Gravimétrico; extracción con solventes [16]	Máximo 25 % ^a ; Máximo 40 % ^b	58,6 % ± 2,1 %
Solubles en etanol	Gravimétrico; extracción con solventes [16]	Mínimo 35 % ^a ; Mínimo 30 % ^b	15,7 % ± 1,6 %
Índice de oxidación	Tiempo de decoloración solución KMnO ₄ 0,1 N [16]	Máximo 22 segundos ^{a,b}	120 s ± 7 s
Compuestos fenólicos	Espectrofotométrico [17-19]	Mínimo 5 % (expresados como ácido gálico) ^{a,b}	2,9 % ± 0,3 %
Flavonoides	Espectrofotométrico [20]	Mínimo 0,5 % ^{a,b}	0,2 % ± 0,01 %
Espectro de absorción UV-VIS	Espectrofotométrico [16]	Señales características de las principales clases de flavonoides entre 200 y 400 nm ^a , 270 y 315 nm ^b .	Presenta un máximo de absorción entre 270 y 315 nm.
Plomo	Ensayo límite [14]	Máximo 2,0 mg/Kg ^b	< 2,0 mg/Kg
Arsénico	Plasma de acoplamiento inductivo [15]	Máximo 1,0 mg/Kg ^b	0,2 mg/Kg

^aLegislación brasilera [12, 13]. ^bLegislación argentina [11].

Tabla 5. Eficiencia de extracción del material lipídico del propóleo utilizando diferentes métodos (n-hexano).

Método de extracción	Resultados
Goldfish	58,6 % \pm 2,1 %
Randall	46,9 % \pm 4,1 %

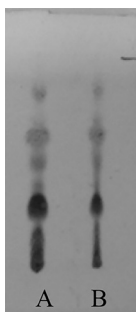


Figura 1. Cromatofolio del material lipídico extraído de propóleos con n-hexano por los métodos de: A) Randall y B) Goldfish. Fase móvil: cloroformo, revelador Godin.

Teniendo en cuenta que el método de preparación de las partículas lipídicas usualmente emplea AcOEt como solvente orgánico, se investigó la eficiencia de extracción utilizando este solvente y el método de Randall. Los resultados indican un 63,5 % \pm 1,6% de eficiencia de extracción, mayor a la obtenida con n-hexano, donde además de los lípidos, el AcOEt podría extraer una mayor diversidad de componentes del propóleos (ver figura 2).

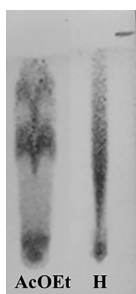


Figura 2. Cromatofolio del material lipídico extraído de propóleos a través del método Randall usando como solventes AcOEt y n-hexano (H). Fase móvil: cloroformo:AcOEt (70:30), revelador Godin.

El material lipídico extraído a partir del propóleos, tanto con n-hexano como con AcOEt, se caracterizó por diferentes técnicas. La figura 3 presenta los resultados del

análisis por DSC, observándose durante el calentamiento una señal endotérmica correspondiente a la fusión y durante el enfriamiento la señal exotérmica propia de la cristalización del material. Los rangos de fusión y de cristalización son amplios (ver tabla 6), lo que sugiere una mezcla de sustancias.

Tabla 6. Resultados del análisis por DSC del material lipídico extraído por el método de Randall.

Material extraído con:	Rango de fusión				Rango de cristalización			
	Inicio (°C)	Señal de fusión (°C)	Final (°C)	ΔH de fusión (J/g)	Inicio (°C)	Señal de cristaliza. (°C)	Final (°C)	ΔH de cristalizac. (J/g)
n-hexano	50,6	64,7	68,0	44,8	63,8	61,5	49,2	-40,1
AcOEt	52,4	67,5	69,6	42,1	65,0	61,5	50,6	-36,1

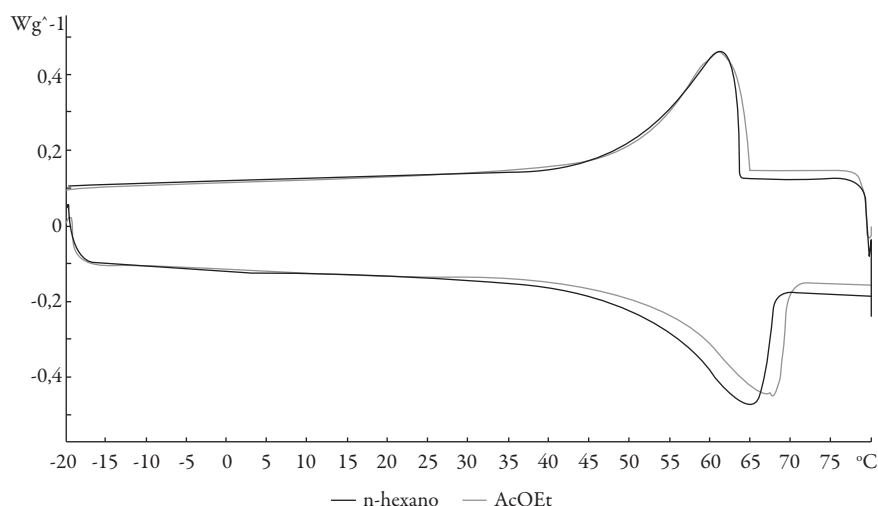


Figura 3. Termograma del material lipídico extraído del propóleo por el método de Randall utilizando n-hexano o AcOEt como solventes.

Los resultados de espectroscopía IR (KBr) (ver figura 4) presentan las señales características de la cera de abejas según como lo reportan Birshtein y Tul'chinskii [39]. Así, por ejemplo, existe una señal intensa alrededor de 1710 cm^{-1} atribuida a grupos carboxilo no ionizados. La banda ancha entre 3200 cm^{-1} y 3450 cm^{-1} corresponde a la vibración de estiramiento de los grupos hidroxilo de los alcoholes, y las bandas a 2851 cm^{-1} y 2916 cm^{-1} se presentan por las vibraciones de estiramiento de enlaces CH, complementado por la señal en 1462 cm^{-1} de vibraciones de deformación CH, y en 721 cm^{-1} de

deformaciones esqueléticas no planares de cadenas largas hidrocarbonadas, tal como se esperaba debido a la presencia de alcanos.

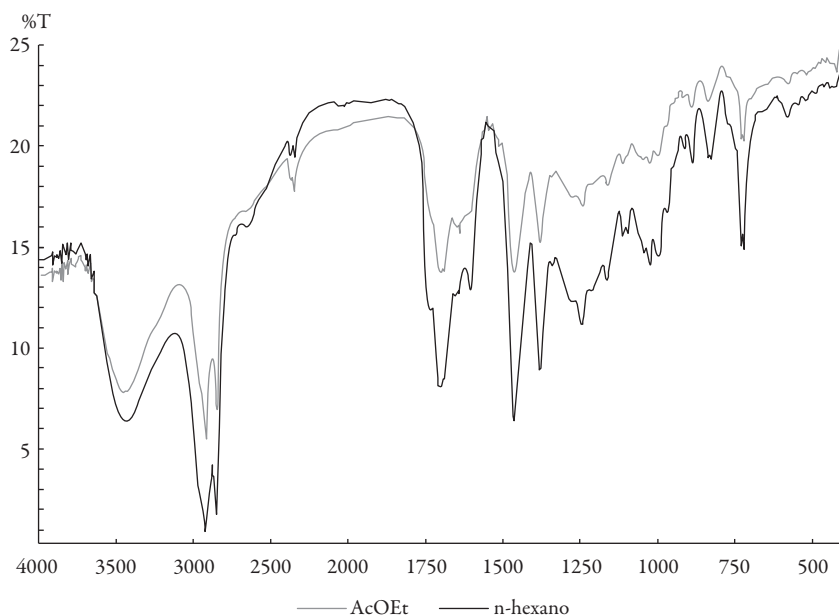


Figura 4. Espectros de infrarrojo (KBr) del material lipídico extraído del propóleo según el solvente de extracción. En rosado: AcOEt; en gris: n-hexano.

De otro lado, de acuerdo con los resultados de XRD (ver figura 5), el material lipídico extraído del propóleo tiene zonas cristalinas que son similares independientemente del solvente utilizado para la extracción.

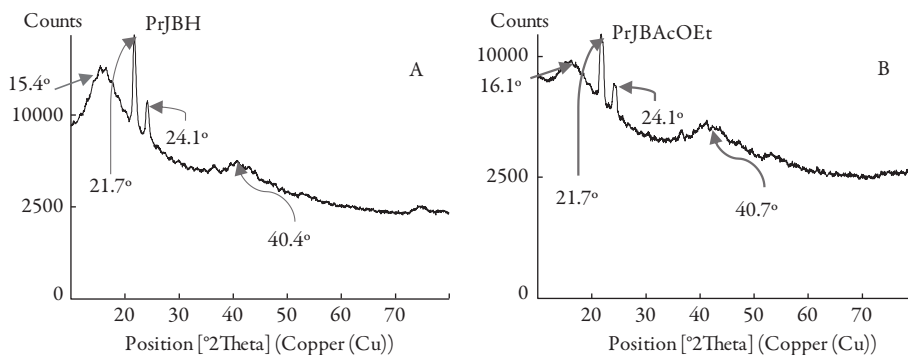


Figura 5. Difracción de rayos X (XRD) del material lipídico extraído: A) n-hexano; B) AcOEt

Preparación y caracterización de partículas lipídicas a partir del material extraído del propóleo

Utilizando como método de preparación la técnica de emulsificación-difusión se investigaron la formulación y las condiciones de operación más adecuadas para la obtención de partículas lipídicas, a partir del material extraído del propóleo. Con el propósito de favorecer la incorporación de componentes activos, se prefirió la preparación de transportadores lipídicos nanoestructurados (NLC, *Nanostructured Lipid Carriers*), lo que requiere la inclusión de un lípido líquido en la formulación.

En la figura 6 se presentan los resultados del diseño estadístico de Plackett-Burman a partir de los que se deduce que la velocidad de emulsificación y el agente estabilizante PVA influyen en el tamaño de partícula; el aceite de ajonjolí y la velocidad de emulsificación gobiernan la polidispersidad, y ningún factor tiene efecto significativo en la no formación de agregados. La interpretación en conjunto de los resultados obtenidos, en los que se busca el menor tamaño de partícula, la más baja polidispersidad y la menor posibilidad de formación de agregados, sustenta la formulación prototipo y las condiciones de trabajo a utilizar.

En síntesis, las partículas se pueden preparar a partir de 100 mg de material extraído del propóleo, 10 mg de CCT, 10 mL de AcOEt previamente saturado con agua y 40 mL de una fase acuosa previamente saturada en AcOEt que contiene como agentes estabilizantes PLX (0,5 g) y PVA (0,5 g). Como condiciones de emulsificación se prefiere una velocidad de 11200 rpm durante 5 min. Las partículas resultantes tienen un tamaño aproximado de $226 \text{ nm} \pm 7 \text{ nm}$ y un índice de polidispersidad inferior a $0,09 \pm 0,02$. La señal principal de tamaño de partícula corresponde al 100% de la respuesta.

De otro lado, el potencial zeta de las partículas lipídicas preparadas a partir del material extraído de propóleos es menor a $\pm 2 \text{ mV}$ y no es afectado por el pH del medio en el que se realiza la lectura (ver figura 7A). Esto sugiere un mecanismo de estabilización del sistema particulado en el que predomina el efecto estérico. De hecho, se ha reportado que el PLX se adsorbe en la superficie de la partícula considerando la posible afinidad de su bloque central de polioxipropileno con los lípidos. Los bloques hidrofílicos de polioxietileno permanecen en la fase acuosa estabilizando el sistema por repulsión estérica [40]. Por otro lado, considerando el pequeño tamaño de la unidad monomérica del PVA, este podría interactuar con los lípidos ubicándose tanto en la superficie como al interior de las partículas, ejerciendo igualmente un efecto estérico [41]. Para verificar lo anterior, se realizó un ensayo de agregación inducida de las partículas obteniendo una concentración crítica de agregación de 0,7 M de Na_2SO_4 . Una vez agregadas las partículas es imposible su redispersión (ver figura 7B).

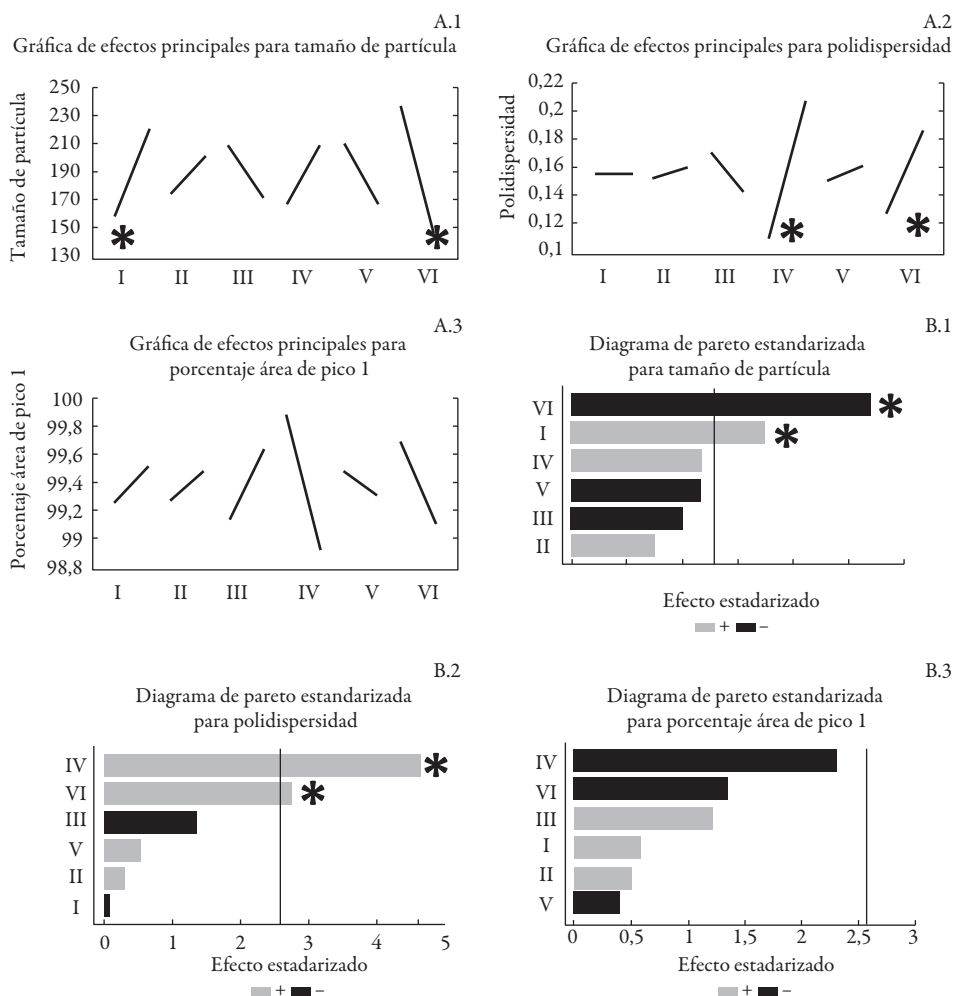


Figura 6. Resultados de los efectos de las diferentes variables investigadas en el diseño experimental de Plackett-Burman en la preparación de partículas lipídicas a partir de material extraído del propóleos. **A)** Gráficas de efectos principales; **B)** Diagramas de Pareto estandarizados: gris, nivel alto; negro, nivel bajo. Variables respuesta: 1) Tamaño de partícula; 2) Polidispersidad; 3) Porcentaje de la señal principal. En números romanos: I: PVA; II: PLX; III: CCT; IV: Aceite de ajonjolí; V: Tiempo de emulsificación; VI: Velocidad de emulsificación. Las estrellas señalan las variables con efectos significativos.

Para verificar que aún con un bajo potencial zeta se garantiza un mínimo de estabilidad de los sistemas lipídicos preparados, las dispersiones de partículas obtenidas, según

las condiciones anteriores y utilizando material extraído tanto con AcOEt como con n-hexano, fueron evaluadas respecto a su estabilidad a temperatura de laboratorio y a 40 °C. Como se observa en la figura 8, las variaciones del diámetro hidrodinámico de las partículas en función del tiempo no superan los 30 nm, lo que en la práctica del trabajo con sistemas nanoparticulados no se considera significativo.

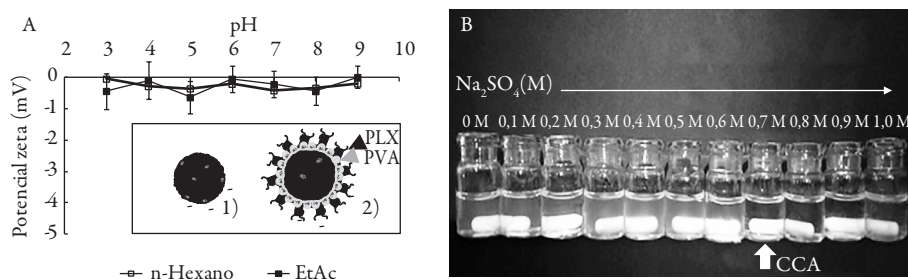


Figura 7. A) Comportamiento del potencial zeta de partículas lipídicas a base de propóleos en función del pH, según sean preparadas utilizando n-hexano o AcOEt como solvente orgánico. En el recuadro se ilustra la posible estructura de la partícula: 1) Partícula lipídica sin agente estabilizante; 2) Partícula lipídica con agentes estabilizantes. B) Comportamiento de las dispersiones frente a diferentes concentraciones de Na₂SO₄ (M). CCA: Concentración Crítica de Agregación.

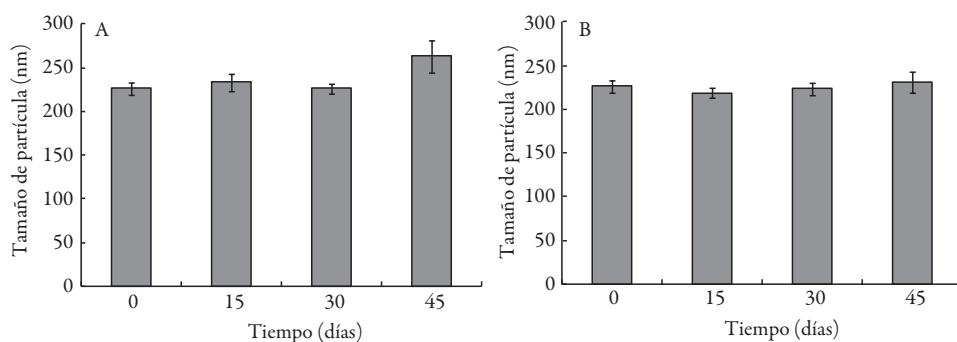


Figura 8. Comportamiento del tamaño de partícula durante el estudio de estabilidad de dispersiones acuosas de partículas lipídicas: A) 18 °C ± 3 °C; B) 40 °C ± 1 °C.

Evaluación de las partículas lipídicas respecto a su potencial citotóxico *in vitro*

La toxicidad de los sistemas nanoparticulados es relevante teniendo en cuenta su potencial aplicación en los campos farmacéutico y cosmético. La mayoría de estudios

de viabilidad celular de los nanotransportadores (e.g. NLC) se han desarrollado por el ensayo de MTT [42]. Sin embargo, la técnica que usa NR también es útil, porque se fundamenta en que este colorante penetra con rapidez la membrana celular por difusión no iónica, acumulándose especialmente dentro de los lisosomas. Los cambios celulares ocasionados por los tratamientos hacen que las células pierdan su capacidad de incorporar y unir las moléculas de rojo neutro [43].

En esta investigación se llevaron a cabo pruebas en las líneas celulares de fibroblastos murinos 3T3/Balb-c y queratinocitos epidermales modificados humanos, debido a que son modelos biológicos alternativos válidos para la evaluación de seguridad de productos cosméticos. Los resultados presentados en la tabla 7 evidencian que la muestra evaluada no tiene efecto citotóxico en ninguna de las dos líneas celulares, lo que indica un buen margen preliminar de seguridad para uso en la formulación de productos destinados a aplicación tópica.

Tabla 7. Ensayos de citotoxicidad de las dispersiones de partículas lipídicas preparadas

Citotoxicidad en fibroblastos 3T3/Balb-c (Captación del colorante rojo neutro)				
Muestra	Concentración empleada	HTD (ppm)	EC ₉₀ (ppm)	Concepto final
Dispersiones de partículas lipídicas	8 concentraciones diferentes de 50-2000 ppm	> 2000	> 2000	Irritante mínimo
Citotoxicidad en queratinocitos humanos (MTT)				
Muestra	Concentración empleada	EC ₅₀ (ppm)	EC ₉₀ (ppm)	
Dispersiones de partículas lipídicas	8 concentraciones diferentes de 50-2000 ppm	2000,3	272,3	

Incorporación de aceite del árbol de té en NLC preparados a base de material extraído del propóleos

Con el propósito de verificar la posible aplicación de las partículas lipídicas, obtenidas a partir del propóleos como transportadores de activos de interés cosmético, se investigó la incorporación del TTO, un reconocido agente antifúngico y antibacterial [44]. La encapsulación de este activo se evaluó preliminarmente por TLC (ver figura 9). Los resultados de la observación al ultravioleta, y al revelar con anisaldehído-ácido sulfúrico, detectan la presencia de terpenoides y de propilpropanoides [36], tanto en la composición del propóleos como del TTO. Como se observa, los cromatogramas de las partículas que incorporan aceite son notablemente diferentes a aquellos de las partículas blanco. Sin embargo, por medio de esta técnica no fue posible confirmar la incorporación de TTO debido, posiblemente, a la baja concentración adicionada (máximo 5 mg) y a la similitud en la polaridad de los componentes del aceite y del material lipídico empleado para la preparación de las partículas.

Además, para complementar lo anterior, se llevaron a cabo análisis por espectroscopía de IR a partir de los que se evidencia el atrapamiento del TTO. Como se observa en la figura 10, en el espectro de las partículas se incrementa la intensidad de la señal en 2345 cm^{-1} , la que es característica del espectro del aceite esencial.

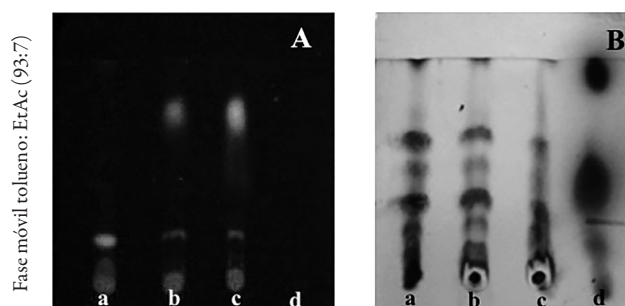


Figura 9. TLC usando como fase móvil tolueno:AcOEt (93:7) A) Cromatofolio visto a 365 nm previo a revelar. B) Cromatofolio revelado con anisaldehído-ácido sulfúrico. a) Material lipídico extraído en n-hexano; b) Formulación prototipo liofilizada sin inclusión de TTO; c) Formulación con inclusión de TTO; d) TTO.

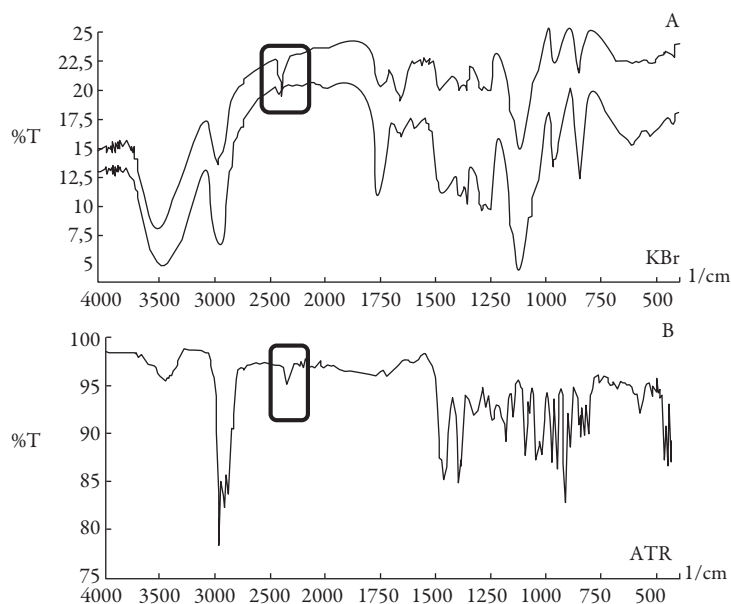


Figura 10. A) Espectros IR (KBr) de partículas lipídicas liofilizadas. Arriba: conteniendo aceite del árbol de té; abajo: partículas blanco. B) Espectro IR (ATR) del TTO.

CONCLUSIONES

El material lipídico y otros extractables en AcOEt o n-hexano, presentes en el propóleos, pueden ser utilizados exitosamente en la preparación de NLC y brindan una novedosa alternativa para diseñar sistemas a escala nanométrica de posible aplicación como portadores de ingredientes activos, tales como el TTO. Esto ofrece un impacto positivo tanto para el campo apícola como para el cosmético, al darle valor agregado a este producto de la colmena y al abrir nuevas posibilidades de investigación conducentes al desarrollo de productos cosméticos innovadores.

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo de investigación fue financiado por la Vicerrectoría de Investigación, Programa Nacional de Semilleros de Investigación, Creación e Innovación de la Universidad Nacional de Colombia 2013–2015, proyecto: Ceras de propóleos como material de partida para la preparación de partículas sólidas lipídicas de interés para las industrias farmacéutica y cosmética. Código 28405. Agradecimientos especiales al Jardín Botánico de Medellín “Joaquín Antonio Uribe” y al Programa Estímulos a la Investigación “Thomas van der Hammen” del Jardín Botánico de Bogotá “José Celestino Mutis”.

CONFLICTO DE INTERESES

Parte de este trabajo fue presentado en el XXII Congreso Latinoamericano de Químicos Cosméticos (COLAMIQC 2015) en la ciudad de Punta del Este (Uruguay), y fue reconocido con el premio “José Joaquín Pérez Villalba”, otorgado por la FELASCC al mejor trabajo sobre materias primas naturales de origen latinoamericano de interés en cosméticos.

REFERENCIAS

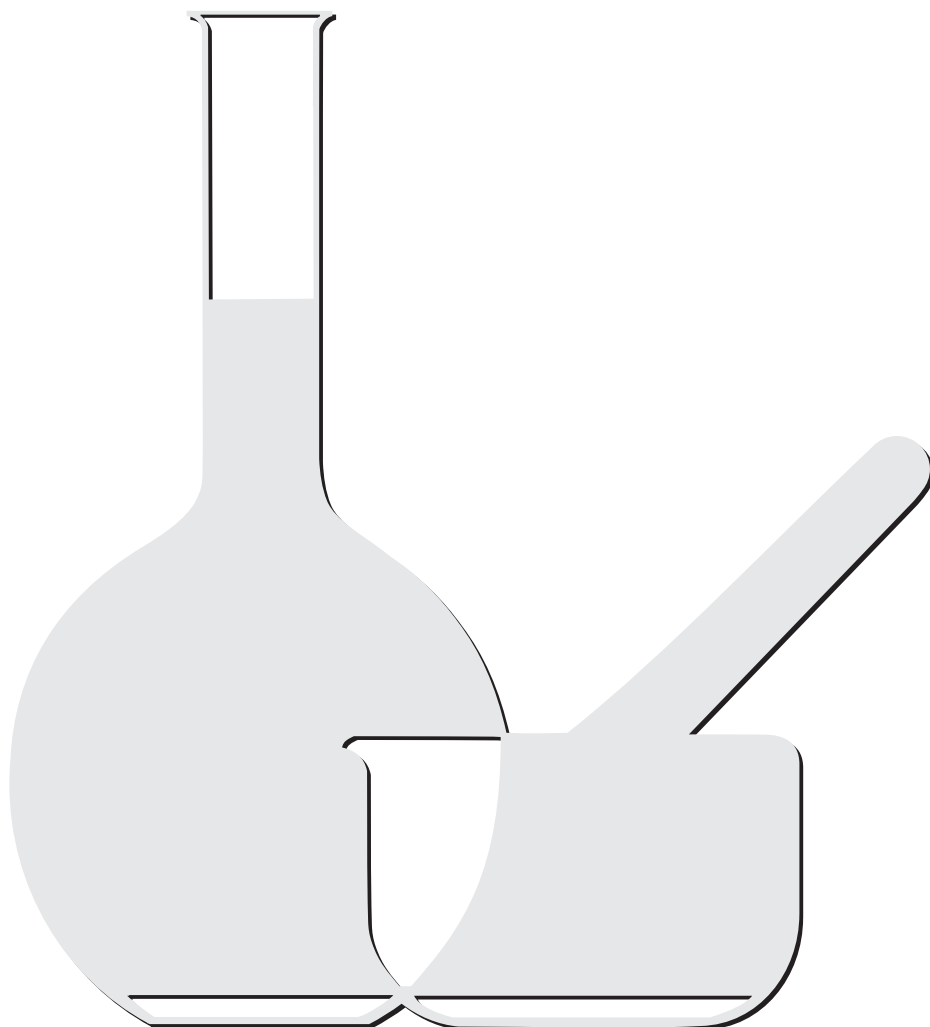
1. M.C. Roco, C.A. Mirkin, M.C. Hersam, Nanotechnology research directions for societal needs in 2020: Summary of international study, *J. Nanoparticle Res.*, **13**, 897 (2011).
2. S. Raj, Sh. Jose, U.S. Sumod, M. Sabitha, Nanotechnology in cosmetics: Opportunities and challenges, *J. Pharm. Bioallied Sci.*, **4**, 186(2012).
3. D.F. Cortés-Rojas, C.R.F. Souza, W.P. Oliveira, Encapsulation of eugenol rich clove extract in solid lipid carriers, *J. Food Eng.*, **127**, 34 (2014).

4. M. Gaumet, A. Vargas, R. Gurny, F. Delie, Nanoparticles for drug delivery: The need for precision in reporting particle size parameters, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **69**, 1 (2008).
5. S. Bose, Y. Du, P. Takhistov, B. Michniak-Kohn, Formulation optimization and topical delivery of quercetin from solid lipid based nanosystems, *Int. J. Pharm.*, **441**, 56 (2013).
6. S. Golmohammadzadeh, M. Mokhtari, M.R. Jaafari, Preparation, characterization and evaluation of moisturizing and UV protecting effects of topical solid lipid nanoparticles, *Braz. J. Pharm. Sci.*, **48**, 683 (2012).
7. D. Nesseem, Formulation of sunscreens with enhancement sun protection factor response based on solid lipid nanoparticles, *Int. J. Cosmet. Sci.*, **33**, 70 (2011).
8. D. Quintanar-Guerrero, D. Tamayo-Esquivel, A. Ganem-Quintanar, E. Allémann, E. Doelker, Adaptation and optimization of the emulsification-diffusion technique to prepare lipidic nanospheres, *Eur. J. Pharm. Sci.*, **26**, 211 (2005).
9. R.H. Müller, M. Radtke, S.A. Wissing, Solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC) in cosmetic and dermatological preparations, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **54** Suppl. 1, S131 (2002).
10. G.A. Burdock, Review of the biological properties and toxicity of bee propolis (propolis), *Food Chem. Toxicol.*, **36**, 347 (1998).
11. Secretaría de Políticas, Regulación e Institutos (SPReI) y Secretaría de Agricultura, Ganadería y Pesca (SAGPyA), Resolución Conjunta 94/2008 y 357/2008. (SENASA, 2008). URL: <http://www.senasa.gov.ar/contenido.php?to=n&in=1197&io=7859>, consultado en agosto de 2014.
12. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Instrução Normativa No 3, de 19 de Janeiro de 2001, Regulamentos técnicos de identidade e qualidade de apitoxina, cera de abelha, geléia real, geléia real liofilizada, pólen apícola, própolis e extrato de própolis, Anexo VI, Anexo VII (Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária, Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal (DIPOA), 2001). URL: <http://www.sfdk.com.br/imagens/lei/MA - Inst Norm 3.htm#AnexoVI>, consultado en agosto de 2014.
13. CATEF, Nota técnica sobre o registro de produtos contendo própolis, Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), Câmara Técnica de Medicamentos

- Fitoterápicos -CATEF, 2005. URL: <http://www.anvisa.gov.br/medicamentos/catef/propolis.htm#req>, consultado en agosto de 2014.
14. US Pharmacopeia, USP 38–NF 33. The United States Pharmacopeia-The National Formulary, The United States Pharmacopeial Convention, Rockville, MD, 2014, pp. 195-197.
 15. E.W. Rice, R.B. Baird, A.D. Eaton, L.S. Clesceri (editores), “Standard Methods Examination of water and wastewater”, 22nd ed., American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation, 2012, pp. 40-46.
 16. E. Bedascarrasbure, L. Maldonado, W. Fierro Morales, A. Álvarez (editores), “Propóleos: caracterización y normalización de propóleos argentinos. Revisión y actualización de composición y propiedades”, INTA, Ediciones Magna, Tucumán, 2006, pp. 137-170.
 17. S. Kumazawa, T. Hamasaka, T. Nakayama, Antioxidant activity of propolis of various geographic origins, *Food Chem.*, **84**, 329 (2004).
 18. V.L. Singleton, J.A. Rossi, Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents, *Am. J. Enol. Vitic.*, **3**, 144 (1965).
 19. K. Slinkard, V. Singleton, Total phenol analysis: Automation and comparison with manual methods, *Am. J. Enol. Vitic.*, **28**, 49 (1977).
 20. C.S. Funari, V.O. Ferro, Análise de própolis, *Ciênc. Tecnol. Aliment. Campinas*, **26**, 171 (2006).
 21. K. Avgoustakis, A. Beletsi, Z. Panagi, P. Klepetsanis, E. Livaniou, G. Evangelatos, D.S. Ithakissios, Effect of copolymer composition on the physicochemical characteristics, *in vitro* stability, and biodistribution of PLGA–mPEG nanoparticles, *Int. J. Pharm.*, **259**, 115 (2003).
 22. ECVAM, The neutral red cytotoxicity assay Invitox N. ° 64: Eye irritation, 1992.
 23. ECVAM, 3T3 NRU Phototoxicity Assay Invitox No. 78: Phototoxicity, 2002.
 24. Belcorp, “In vitro Safety screening to predict ocular irritation of cosmetic formulations”, Protocol #3: Neutral red uptake cytotoxicity assay in mammalian cells (fibroblast), 2012.
 25. M.C. Marcucci, Propolis: Chemical composition, biological properties and therapeutic activity, *Apidologie*, **26**, 83 (1995).

26. V.S. Bankova, S.L. de Castro, M.C. Marcucci, Propolis: Recent advances in chemistry and plant origin, *Apidologie*, **31**, 3 (2000).
27. A.C. de Groot, Propolis: A review of properties, applications, chemical composition, contact allergy, and other adverse effects, *Dermatitis*, **24**, 263 (2013).
28. B.M. Hausen, E. Wollenweber, H. Senff, B. Post, Propolis allergy (I). Origin, properties, usage and literature review, *Contact Dermatitis*, **17**, 163 (1987).
29. A. dos S. Pereira, B. Bicalho, F.R. de Aquino Neto, Comparison of propolis from *Apis mellifera* and *Tetragonisca angustula*, *Apidologie*, **34**, 291 (2003).
30. ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária, "Farmacopéia Brasileira", 2010, pp. 192–193.
31. AOAC International, "Official Methods of AOAC International", Editado por G.W. Latimer, AOAC International, Gaithersburg, 2012, Method 930.15.
32. AOAC International, "Official Methods of AOAC International", Editado por G.W. Latimer, AOAC International, Gaithersburg, 2012, Method 923.03.
33. M. Simone-Finstrom, M. Spivak, Propolis and bee health: The natural history and significance of resin use by honey bees, *Apidologie*, **41**, 295 (2010).
34. L.E. Rodríguez-Rodríguez, W. Góngora-Amores, A. Escalona-Arias, M.B. Miranda-Bazán, S. Batista-Suárez, Y. Bermúdez-Cisnero, Optimización de la extracción alcohólica para la obtención de soluciones concentradas de propóleos, *Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm.*, **44**, 47 (2015).
35. L.E. Rodríguez-Rodríguez, W. Góngora-Amores, A. Escalona-Arias, D. Cobos-Valdés, S. Batista-Suárez, C. Loustanaú-Cárdenas, A.F. González-González, Resultados del proceso productivo de la solución concentrada de propóleos 2010-2013. Impacto de la innovación tecnológica, *Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm.*, **44**, 139 (2015).
36. H. Wagner, S. Bladt, "Plant drug analysis. A Thin Layer Chromatography atlas", Springer, Berlin, Heidelberg, 2001, pp. 151-152, 196-197, 364.
37. Ö.G. Çelemlı, Chemical properties of propolis collected by stingless bees. En: "Pot-Honey: A legacy of stingless bees", Editado por P. Vit, S.R.M. Pedro, D.W. Roubik, Springer, New York (NY), 2013, pp. 525-537

38. É.W. Teixeira, D. Message, G. Negri, A. Salatino, P.C. Stringheta, Seasonal variation, chemical composition and antioxidant activity of Brazilian propolis samples, *Evid.-Based Complement. Alternat. Med.*, **7**, 307 (2010).
39. V.Y. Birshstein, V.M. Tul'chinskii, Determination of beeswax and some impurities by IR spectroscopy, *Chem. Nat. Compd.*, **13**, 232 (1977).
40. M. Musoke, P.F. Luckham, Interaction forces between polyethylene oxide-polypropylene oxide ABA copolymers adsorbed to hydrophobic surfaces, *J. Colloid Interface Sci.*, **277**, 62 (2004).
41. K.M. Rosenblatt, H. Bunjes, Poly(vinyl alcohol) as emulsifier stabilizes solid triglyceride drug carrier nanoparticles in the alfa-modification, *Mol. Pharm.*, **6**, 105 (2009).
42. S. Doktorovova, E.B. Souto, A.M. Silva, Nanotoxicology applied to solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers -A systematic review of *in vitro* data, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **87**, 1 (2014).
43. G. Repetto, A. del Peso, J.L. Zurita, Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity, *Nat. Protoc.*, **3**, 1125 (2008).
44. C.F. Carson, K.A. Hammer, T.V. Riley, *Melaleuca alternifolia* (Tea Tree) oil: A review of antimicrobial and other medicinal properties, *Clin. Microbiol. Rev.*, **19**, 50 (2006).



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 o el comité editorial lleven a cabo

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

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

Todos los manuscritos deben incluir:

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

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

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

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

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

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

Los datos espectroscópicos se deben presentar de la siguiente manera:

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

IR 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 anejarán 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 N.º 45-03
Fax: 57-1-3165060
Bogotá – Colombia
Correo electrónico:
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, 45(1)
se terminó de imprimir y encuadernar
en Proceditor, sobre papel bond de 90 gramos
Bogotá, D. C., Colombia.