

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(2), agosto 2016

REVISTA COLOMBIANA DE CIENCIAS QUÍMICO-FARMACÉUTICAS

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

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

Correo electrónico: rcqijfa_febog@unal.edu.co

<http://www.revistas.unal.edu.co/index.php/rcqijfa>

http://www.scielo.org/co/scielo.php?script=sci_serial&pid=0034-7418&rep=

<https://scholar.google.com/citations?user=TvBT68s.AAAJ&hl=es>

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

Vicerrector sede Bogotá: Jaime Franky Rodríguez, M. Sc.

Decano Facultad de Ciencias: Jaime Aguirre Ceballos, Ph. D.

Directora Departamento de Farmacia: Lucy Gabriela Delgado Murcia, Ph. D.

Director Área Curricular de Farmacia: Fleming Martínez Rodríguez, Ph. D.

Director-Editor Revista Colombiana de Ciencias Químico-Farmacéuticas:

Fleming Martínez Rodríguez, 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. Itache, Ph. D., Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica, Facultad de Farmacia, Universidad de Navarra, España.

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

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

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

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

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

Comité Editorial:

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

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

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

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

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

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

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

Evaluadores:

Claudia E. Mora, Ph. D., Departamento de Farmacia, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, D. C., Colombia.

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

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

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

José Degrossi, Ph. D., Cátedra de Higiene y Sanidad, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires, Argentina.

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

Lucy G. Delgado, Ph. D., Departamento de Farmacia, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, D. C., Colombia.

Susana Nuñez Montoya, Departamento de Farmacia, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba, Argentina.

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

Asistente editorial: Anyeli A. Rivera, B. A. (C)

Edición, armada electrónica e impresión: Procceditor Ltda., Bogotá. Teléfonos: 757 9200. Fax: ext. 102. Correo electrónico: procceditor@yahoo.es

MISIÓN

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 (ver 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.

VISIÓN

En pro de la difusión de las investigaciones, los contenidos de la *Revista Colombiana de Ciencias Químico-Farmacéuticas* son de acceso libre, con ello se espera llegar a un número mayor de lectores, propiciando la consolidación de comunidades académicas. Además, se proyecta que los contenidos publicados contribuyan al desarrollo e innovación de las ciencias farmacéuticas.

ÉTICA

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. Esta revista sigue los lineamientos del COPE (Committee on Publication Ethics), que pueden ser consultados en <http://publicationethics.org/>

LICENCIA CREATIVE COMMONS



Todo el contenido de esta revista, excepto dónde está identificado, está bajo una Licencia Creative Commons de atribución aprobada en Colombia. Consulte la normativa en: http://co.creativecommons.org/?page_id=13

La totalidad de los números anteriores se encuentran disponibles en el sitio web: <http://www.revistas.unal.edu.co/index.php/rcqijfa>

Contenido

- Investigación básica experimental para la definición de los parámetros críticos en el proceso de obtención de soluciones concentradas de propóleos (SCP)
Luis E. Rodríguez Rodríguez, Antonio R. Miranda Cruz, Ariel Escalona Arias, Walter Góngora Amores, Saide Batista Suárez, Dailín Cobos Valdés 179
- Synthesis, characterization and antibacterial screening of some Schiff bases derived from pyrazole and 4-amino antipyrine
Shipra Baluja, Sumitra Chanda 201
- Eletrossíntese de anestesia. Uma descrição matemática
Volodymyr V. Tkach, Sílvio C. de Oliveira, Reza Ojani, Olena I. Aksimentyeva Olga Yelenich, Petró I. Yagodynets ' 219
- O mecanismo do desempenho de poli-2-mercaptobenzimidazol na detecção eletroquímica de colesterol e as suas representações eletroquímica e matemática
Volodymyr V. Tkach, Sílvio C. de Oliveira, Mohammad Reza M. Hosseini, Reza Ojani, Olga V. Yelenich, Petró I. Yagodynets ' 234
- Drug information centers: An overview to the concept
Mónica Alexandra Nova Manosalva, José Julián López Gutiérrez, Martín Cañas 243
- Solution thermodynamics and preferential solvation of 3-chloro-N-phenyl-phthalimide in acetone + methanol mixtures
Grecia Angeline del Mar Areiza Aldana, Aleida Cuellar Lozano, Nasly Alexandra Peña Carmona, Diego Iván Caviedes Rubio, Abbas Mehrdad, Amir Hossein Miri, Gerson Andrés Rodríguez Rodríguez, Daniel Ricardo Delgado 256
- Efecto del aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* sobre *Porphyromonas gingivalis* cultivada *in vitro*
Diego M. Bonilla, Yulitza Mendoza, Campo E. Moncada, Ozkarina Murcia, Ángela P. Rojas, Jairo Calle, Roberto Pinzón, Lina Nerio 275
- Biotipos y susceptibilidad antimicrobiana de *S. mutans* en niños con y sin caries dental
Fredy Gamboa, Dabeiba-Adriana García, Claudia Patricia Lamby, Ana Lucía Sarralde 288
- Cosmetovigilancia: un estudio de alcance
Paola Natalia Cáceres Guevara, Karen Luise Lang, Marcela Aragón Novoa 305

Investigación básica experimental para la definición de los parámetros críticos en el proceso de obtención de soluciones concentradas de propóleos (SCP)

Luis E. Rodríguez Rodríguez¹, Antonio R. Miranda Cruz², Ariel Escalona Arias³, Walter Góngora Amores⁴, Saide Batista Suárez⁵, Dailín Cobos Valdés⁶

Centro de Inmunología y Biopreparados (CIBHO), Grupo Empresarial, LABIOFAM, Avenida de Los Álamos e/Av. Lenin y Calle Mariana de la Torre, Holguín, Cuba.

¹ Correo electrónico: luis@cibho.hlg.sld.cu

² Correo electrónico: antonio@cibho.hlg.sld.cu

³ Correo electrónico: ariel@cibho.hlg.sld.cu

⁴ Correo electrónico: wga@cibho.hlg.sld.cu

⁵ Correo electrónico: saide@cibho.hlg.sld.cu

⁶ Correo electrónico: dailin@cibho.hlg.sld.cu

Recibido para evaluación: 25 de octubre de 2015

Aceptado para publicación: 7 de abril de 2016

RESUMEN

Introducción: los procesos de obtención de SCP han sido desarrollados por diferentes investigadores tanto a nivel nacional como internacional. *Objetivo:* definir los parámetros críticos del proceso de obtención de SCP, para incrementar el rendimiento y la calidad de este producto y sus derivados. *Métodos:* se utilizó el método de purificación de Pichansky, con algunas modificaciones en las siguientes variables: relación masa/volumen, concentración del etanol y el tiempo de agitación. Los materiales utilizados están avalados por el Sistema de Gestión de Calidad del Centro. *Resultados:* las variantes #2 y #4 del proceso de extracción, utilizadas a escala de laboratorio, son las de mejores resultados, ya que se obtuvo un rango de porcentaje sólidos totales entre un 12,4 y 14,3 %, con un rendimiento entre un 48,5 y 83,0 %; siendo seleccionada la variante #4 para elaborar los lotes experimentales a escala de reactor. *Conclusiones:* las variables estudiadas: tiempo de agitación, concentración de etanol y relación masa/volumen, así como el porcentaje de los sólidos totales, el porcentaje

del rendimiento y las propiedades organolépticas, respondieron positivamente en las variantes #2 y #4, las cuales permitieron cumplir con los objetivos propuestos en esta investigación, y pueden emplearse en la elaboración de los lotes productivos dependiendo de la concentración de las soluciones alcohólicas de propóleos que se quieran producir.

Palabras claves: Soluciones concentradas de propóleos, método de obtención, investigación experimental, parámetros de calidad.

SUMMARY

Experimental basic research to define critical parameters in the process of obtaining concentrated solutions of propolis (CSP)

Introduction: SCP's processes of obtaining Propolis have been developed by different investigators so much nationally like international. *Objective:* To define SCP's critical parameters of the process of obtaining, to increment the performance and the quality of this product and his by-products. *Methods:* Pichansky's method of purification, with some modifications was utilized to the variables following: Relation mass/volume, concentration of ethanol and the time of agitation. The utilized materials are guaranteed for the Quality Management System of the Center. *Results:* The variants #2 and #4 of the process of extraction, utilized to scale of laboratory, gave better results, obtaining percentage's range solid totals between 12.4 and 14.3 %, with a performance between 48.5 and 83.0 %. Variant #4 was selected in order to make the experimental lots at reactor scale. *Conclusions:* the studied variables: Time agitation, concentration of ethanol and the relation mass/volume, as well as the percentage of the solid totals, the percentage of the performance and organoleptic properties, of variants #2 and #4, allowed carrying out the objectives proposed in this investigation. These variables responded positively in the variants and can be used in the elaboration of the productive lots considering the concentration of alcoholic propolis' solutions required.

Key words: Solutions concentrated of propolis, method of obtaining, experimental investigation, parameters of quality.

INTRODUCCIÓN

Los productos de las abejas (*Apis mellifera*) han sido utilizados por el hombre desde la antigüedad hasta nuestros días con fines medicinales y nutritivos. Uno de estos productos es el propóleos cuyo nombre proviene de los griegos (*pro*: delante de, y *polis*: ciudad). Aristóteles lo considera como “remedio para las infecciones de la piel, llagas y supuraciones”. Galeno, en el siglo II, menciona el *propolis* en sus trabajos, y el famoso médico y filósofo persa del siglo XI, Avicena, dice del mismo: “Tiene la cualidad de eliminar las puntas de flechas y las espinas, vivifica, limpia fácilmente y ablanda fuertemente”. Además se utilizó por los sacerdotes egipcios como sustancias medicinales.

Entre los años 1899 y 1902, en la guerra Anglo-Boer en el cono sur africano, esta sustancia se empleó en la cura eficaz de heridas infectadas y como sustancia cicatrizante (en aquel entonces se desconocían los antibióticos). Las abejas lo utilizan como cemento para la colmena existiendo evidencias de que la protegen de hongos, bacterias y otros invasores [1].

El propóleos es una matriz compleja, constituida por una gran variedad de compuestos químicos, su composición no es estable y varía según la fuente de procedencia, se caracteriza por tener un 55% de resinas y bálsamos aromáticos, 30% de ceras, 10% de aceites esenciales y 5% de granos de polen [2-3].

Algunos autores plantean la existencia de alrededor de 18 componentes [3] y se señala que entre estos, los principales son flavonoides de los tipos: las flavonas, flavones y las flavononas. Se han reportado distintos compuestos: flavonas (38) entre las que se encuentran: ramnocitrina, kaempferol, crisina, galangina (3, 5, 7-trihidroxiflavona), isalpinina, tectocrisina, acacetina, apigenina, pectolinarigenina; 5, 7-dioxi-3, 4-dimetoxiflavona; 3, 5-dioxi-7, 4-dimetoxiflavona y 5-oxi-7, 4-dimetoxiflavona, derivados del ácido benzoico (12), por ejemplo: ác. hydroxi-4 benzoico, ác. metoxi-4 benzoico, ác. protocatéquico y ác. gálico, derivados del alcohol cinámico (14) y el ác. cinámico, 12 componentes entre alcoholes, cetonas y fenoles, terpenos (7), como el beta-bisabolol y alfa acetoxibetulenól, y sesquiterpeno-farnesol, esteroides (11), azúcares (7) y aminoácidos (2). Empleando métodos cromatográficos y espectroscópicos se han podido aislar y caracterizar de forma inequívoca benzofenonas preniladas, flavonoides, isoflavonoides, polifenoles, ácidos fenólicos y triterpenos [4-13].

El propóleos es ampliamente utilizado en alimentos y bebidas, ya que mejora la salud humana. Este contiene más de 300 compuestos, tales como los polifenoles, aldehídos fenólicos, sesquiterpenos, quinonas, coumarinas, aminoácidos, esteroides y compuestos inorgánicos [14].

En un estudio realizado por nuestro equipo de trabajo para lograr la optimización de las etapas del proceso de extracción de las soluciones concentradas de propóleos (SCP), se demostró la factibilidad del mismo, utilizando una tercera extracción y un nuevo sistema de filtrado a temperatura refrigerada, lográndose valores de los sólidos totales superiores al 16 %, con una pureza y una mejor recuperación de los principios activos teniendo en cuenta los volúmenes y rendimientos obtenidos [15].

El mismo equipo de trabajo realizó un estudio comparativo de lotes de soluciones concentradas de propóleos (SCP) desde el año 2010 hasta el año 2013, obtenidos con diferentes procesos de extracción, comprobándose que el proceso de extracción utilizado en los años el 2012 y el 2013 fue el más efectivo, lográndose SCP con un porcentaje de sólidos totales superior a las especificaciones del Sistema de Gestión de Calidad del Centro de Inmunología y Biopreparados, con un buen rendimiento de principios activos y un volumen total superior, influyendo positivamente el proceso de innovación tecnológica utilizado en los lotes elaborados en los años antes mencionados, aunque no se descarta la posibilidad de seguir mejorando el proceso de extracción, que permita una mayor recuperación de principios activos teniendo en cuenta las normativas nacionales e internacionales [16].

En el mundo existen diferentes procesos de purificación de propóleos entre los que se encuentran los métodos soviético, inglés, y rumano, entre otros. Adanero [17] y Fabricio Ordoñez [18], en sus trabajos describen métodos muy similares al utilizado en el Centro de Inmunología y Biopreparados de Holguín (CIBHO), para la obtención de tinturas madres o soluciones concentradas de propóleos.

También existen otros métodos empleados para la purificación de propóleos establecidos nacional e internacionalmente como son:

Método #1. (Pichansky). Maceración del propóleos en alcohol al 70 % [19].

Método #2. (Patente Cubana). Obtención de fases acuosas, alcohólicas y combinación de ambas [20, 21].

En el Centro de Inmunología y Biopreparados de Holguín, la obtención de la SCP se realiza según lo establecido en el PNO 2.049 “Preparación de la solución concentrada de propóleos” [22], donde se establecen las pautas a seguir en la obtención de dicha solución. Hasta el momento se han obtenido soluciones concentrada de propóleos, con muy buena calidad y que responden con los parámetros de calidad establecidos en el PNO 1017 “Análisis físicoquímicos de propóleos” [23] y la ESP 2503 “Solución alcohólica de propóleos” [24], pero este tiene el inconveniente que al ser un proceso de maceración, el tiempo de extracción es muy prolongado, afectándose la producción

del Centro, ya que el extracto es utilizado como materia prima en la producción de derivados, y esto puede implicar atrasos o incumplimientos en el plan de producción.

Teniendo en cuenta lo anteriormente planteado perseguimos como objetivo general: estipular los parámetros críticos del proceso de obtención de SCP a escala de laboratorio y mini-industria, para incrementar su rendimiento y la calidad de este producto. Y como objetivos específicos los siguientes: 1) Determinar que concentración de etanol más factible para la obtención de la solución concentrada de propóleos, 2) Decretar el tiempo exacto de agitación necesario para la obtención de la Solución concentrada de propóleos a diferentes concentraciones de etanol, 3) Fijar la relación masa/volumen idónea para el proceso de extracción, y 4) Determinar los parámetros de sólidos totales, las propiedades organolépticas, y el rendimiento de las solución concentradas de propóleos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Suministro de la materia prima

La masa de propóleos en bruto utilizada es procedente de la provincia de Holguín, conforme según requisitos establecidos en la especificación ESP0005 [25] del Sistema de Gestión de Calidad implantado, y que fueron recolectados a finales del 2013 y principios del 2014.

El etanol utilizado como vehículo fue suministrado por la Empresa Comercializadora y Distribuidora de Medicamentos (ENCOMED), conforme a los requisitos establecidos en la especificación ESP0010 del Sistema de Gestión de Calidad implantado [26].

Metodología empleada

En el proceso de extracción se utilizaron variantes de la metodología de purificación de propóleos por el Método Pichansky, aplicada internacionalmente y descrita en el PNO 2049 [22] del SGC del CIBHO, para la obtención de las SCP, teniendo en cuenta también el RC 2014 [27], que no es más que el Registro maestro de preparación de las soluciones alcohólicas concentradas de propóleos. Las variantes a utilizar para las extracciones se pueden apreciar en el anexo 1.

El proceso de obtención utilizado en todas las variantes a escala de laboratorio consistió en verter el propóleos en el vaso de precipitados, donde se realizó la extracción que permitió la agitación del producto con el disolvente, a través de un agitador mecánico, variando el tiempo de agitación en las variantes utilizadas. Posteriormente se añadió el menstruo hidroalcohólico con agitación continua hasta que se desintegró, aplicándose calor a una temperatura a 55 °C, según la variante aplicada. Luego enfriar entre 3 a 5 °C

para eliminar material contaminante y extraer el producto terminado, filtrado con gasa o papel de filtro y determinar el volumen final obtenido.

Una vez culminado este proceso, repetir dos veces más el proceso de extracción, y continuar con la filtración de la masa residual.

Al concluir el proceso de filtración se lleva la muestra al laboratorio de calidad para verificar mediante la determinación del porcentaje de sólidos totales y los aspectos de calidad del extracto concentrado obtenido según la ESP 2503 [24] para la SCP.

En cada proceso de extracción se realizaron tres réplicas para estar seguros de los resultados obtenidos.

Para llevar a cabo el último de los objetivos propuesto en nuestro trabajo se extrapoló la obtención de la SCP a escala piloto teniendo en cuenta la variante de mejor resultado en los lotes experimentales a nivel de laboratorio. Se evaluaron nuevamente los parámetros de calidad bajo las mismas condiciones de extracción para las SCP.

Para cumplir con los objetivos propuestos se tuvieron en cuenta varias variables dentro del proceso de extracción como la relación masa/volumen, la concentración de etanol utilizada, el tiempo de agitación, después del proceso de extracción/filtración a temperatura constante, en el caso de la temperatura se mantuvo a 55 °C para todos los lotes experimentales, así como también se tiene en cuenta los parámetros porcentaje del rendimiento obtenido.

Para determinar los parámetros de calidad se consideró la Especificación 2503 [24] del Sistema de Gestión de Calidad de nuestro centro, entre estos se encuentran el porcentaje de sólidos totales y las propiedades organolépticas que se describen a continuación:

Propiedades organolépticas determinadas

- *Aspecto*: líquido sin sedimentos, traslúcido.
- *Color*: pardo rojizo oscuro, puede presentar tonalidades verde amarillentas.
- *Olor*: resinoso alcohólico, característicos del propóleos.
- *Sabor*: resinoso, amargo, alcohólico.

La determinación del porcentaje de sólidos totales de la SCP obtenida en cada lote fue determinada cumpliéndose con lo establecido en el PNO1.017 “Análisis físicoquímico de propóleos” [23].

Los resultados estadísticos se procesaron a través del software Medcacl versión 4.16, para Windows 95 (Copyright© 1993-1997, Franck Shoonjans).

RESULTADOS

En las tablas 1 y 2 se pueden apreciar los diferentes lotes experimentales elaborados, utilizando diferentes variantes del proceso de extracción, así como se exponen los resultados obtenidos al aplicar las variables expuestas y determinar los parámetros establecidos para el control de calidad de las SCP obtenidas. Debemos señalar que en el caso de los lotes F 130001 y F 130003 se decidió no realizar más lotes, debido a los resultados obtenidos, en el porcentaje de sólidos totales que resultaron muy por debajo de las especificaciones establecidas y de acuerdo a los intereses técnico-productivos, que se perseguían para la solución final de SCP.

Tabla 1. Resumen de los resultados de la evaluación de las variables determinadas a los lotes experimentales de SCP a nivel de laboratorio.

Lotes experimentales y sus réplicas	# Variante	Relación masa/volumen	Concentración etanol		Tiempo de agitación
			70 %	96 %	
FI 130001	1	250 g/1000 mL (1/4)	X	-	4 horas
FI 130002	2	250 g/1000 mL (1/4)	-	X	4 horas
FI 130003	3	250 g/1000 mL (1/4)	-	X	2 horas
FI 130004	4	250 g/1500 mL (1/6)	-	X	4 horas
FI 130005*	2	250 g/1000 mL (1/4)	-	X	4 horas
FI 130006**	4	250 g/1500 mL (1/6)	-	X	4 horas

*El lote F 130005 es una réplica de la variante #2.

**El lote F 130006 es una réplica de la variante #4.

Tabla 2. Resumen de los resultados de la evaluación de los parámetros determinados a los lotes experimentales de SCP a nivel de laboratorio.

Lotes experimentales y sus réplicas	# Variante	Valor medio porcentaje sólidos totales	Volumen		Porcentaje rendimiento
			Inicial	Final	
FI 130001	1	5,40	1000 mL	390 mL	39
FI 130002	2	14,10	1000 mL	530 mL	53
FI 130003	3	8,40	1000 mL	432 mL	43,2
FI 130004	4	12,40	1500 mL	780 mL	78,0
FI 130005*	2	14,20	1000 mL	485 mL	48,5
FI 130006**	4	14,30	1500 mL	830 mL	83,0

*El lote F 130005 es una réplica de la variante #2.

**El lote F 130006 es una réplica de la variante #4.

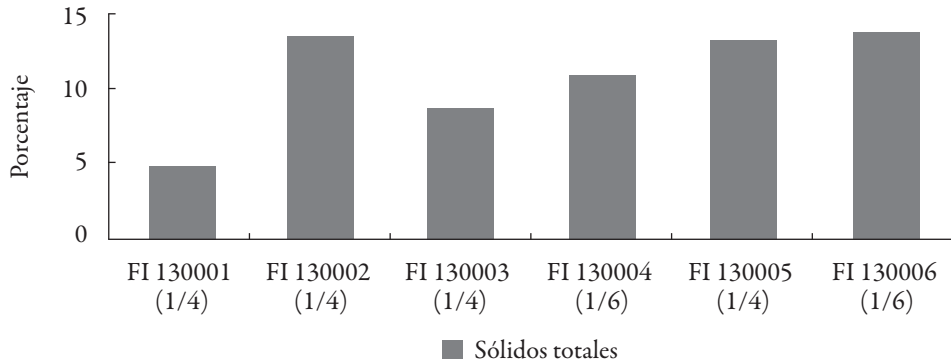
En la tabla 3 se presentan los resultados de las variables estudiadas y los parámetros determinados a los lotes experimentales obtenidos a escala piloto (reactor), después de analizar los resultados obtenidos en los lotes experimentales a escala de laboratorio.

Tabla 3. Resumen con los resultados de la evaluación de los lotes experimentales a nivel de reactor de la SCP. Etanol a 96° en proporción (1/6).

Lotes	Propiedades organolépticas	Porcentaje de S. totales	Masa inicial	Tiempo agitación (h)	Volumen inicial (L)	Volumen final (mL)	Rendimiento (%)
FI 140001	Responde	10,70	30 kg	4	180 (1/6)	119	66,11
FI 140002	Responde	9,6	30 kg	4	180 (1/6)	110	61,11
FI 140003	Responde	8,3	30 kg	4	180 (1/6)	115	63,80

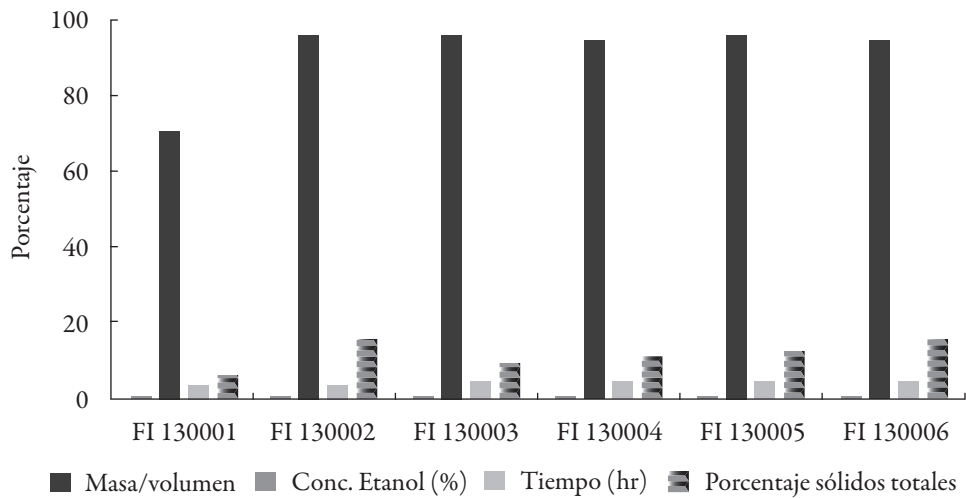
En la figura 1 se muestra la comparación del porcentaje de los sólidos totales, obtenidos en los lotes experimentales de SCP a escala de laboratorio.

Figura 1. Comparación del porcentaje de sólidos totales, como parámetro fundamental en el proceso de obtención de los lotes experimentales de SCP a escala de laboratorio.



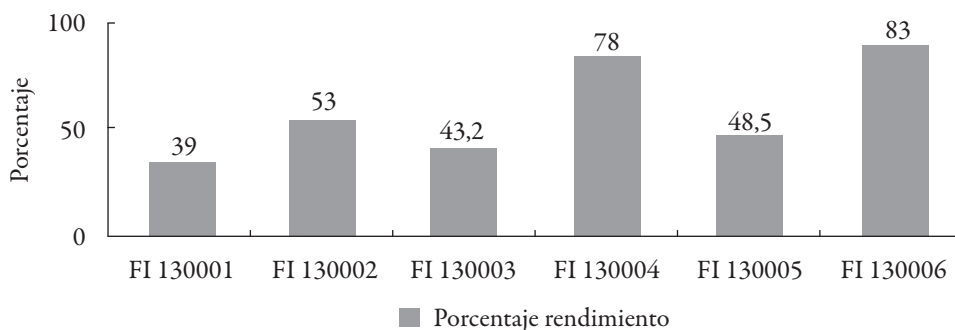
En la figura 2 se refleja la relación que existe entre masa/volumen, concentración de etanol, el tiempo con el porcentaje de sólidos totales.

Figura 2. Relación existente entre masa/volumen, concentración de etanol, el tiempo y el porcentaje de sólidos totales obtenidos en los lotes experimentales de SCP a escala de laboratorio



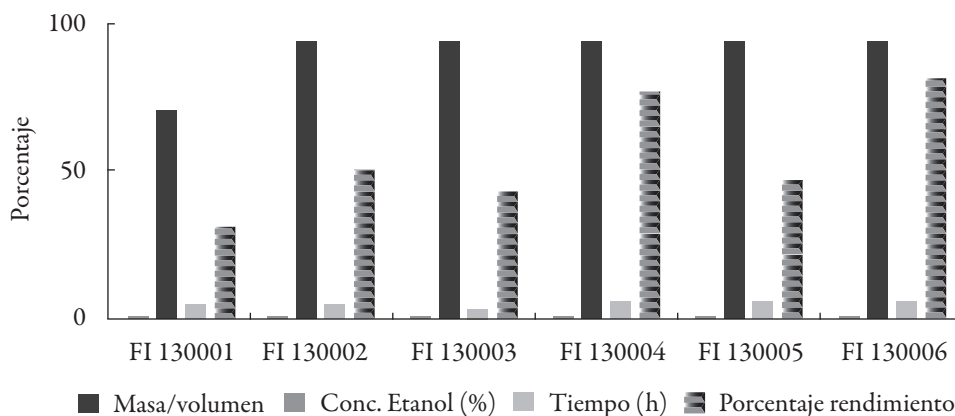
En la figura 3 se muestra la comparación del rendimiento obtenido en los lotes experimentales de SCP a escala de laboratorio.

Figura 3. Comparación del rendimiento final obtenido en los lotes experimentales de SCP a escala de laboratorio.



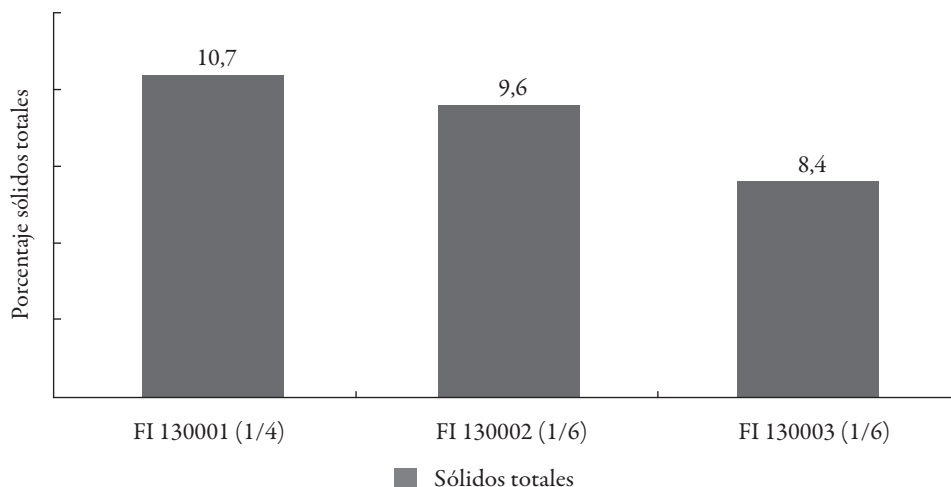
En la figura 4 se refleja la relación que existe entre masa/volumen, concentración de etanol, el tiempo con el porcentaje de rendimiento.

Figura 4. Relación existente entre masa/volumen, concentración de etanol, el tiempo y el porcentaje de rendimiento obtenido en los lotes experimentales de SCP a escala de laboratorio.



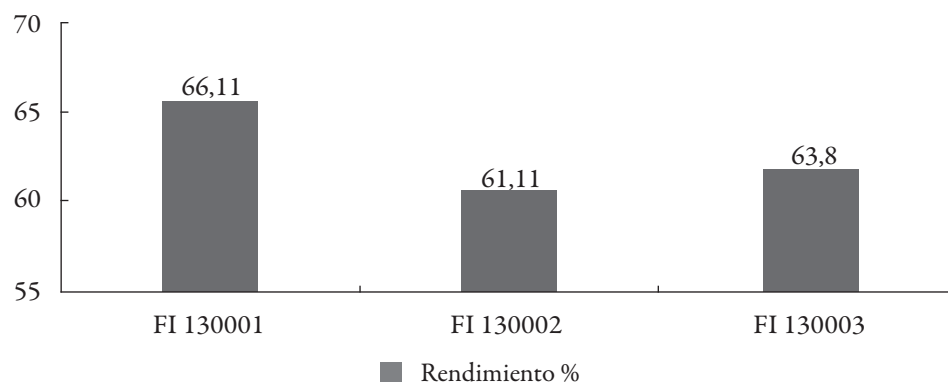
La figura 5 corresponde a la comparación del porcentaje de sólidos totales correspondiente a los lotes experimentales de SCP a nivel de reactor.

Figura 5. Comportamiento de sólidos totales de los lotes experimentales de SCP a nivel de reactor



La figura 6 refiere al comportamiento del rendimiento obtenido en los lotes experimentales de SCP a escala de reactor (lotes FI 140001, FI 140002 y FI 140003).

Figura 6. Comparación del rendimiento obtenido en los lotes experimentales de SCP a escala piloto en el reactor de 124 L. Lotes FI 140001, FI 140002 y FI 140003.



Para verificar la confiabilidad de los resultados obtenidos se realizó un análisis estadístico donde se comparan todas las medias aritméticas determinadas a las variables procesadas en nuestro estudio de los diferentes lotes experimentales elaborados tanto a nivel de laboratorio como a escala piloto. Todos estos resultados aparecen reflejados en los anexos 2 y 3.

DISCUSIÓN

Cuando se realiza un análisis de los resultados obtenidos del proceso de extracción de cada uno de los lotes experimentales, elaborados a nivel de laboratorio (ver tablas 1 a 3) y sus réplicas se observa que para el lote FI 130001 utilizando la variante #1 (anexo 1), se obtuvo una concentración de sólidos totales de 5,84 %, este aspecto no se contradice con lo planteado en la literatura sobre el método de Pichansky, al presentarse un agotamiento casi total de la masa de propóleos en el método de extracción, objetivo que no buscamos en nuestro trabajo, más bien pretendemos obtener SCP y que los resultados de los sólidos totales se acerque lo más posible a los parámetros establecidos en la especificación ESP 2503 de SGC, de nuestro centro, donde se obtienen soluciones concentradas $\geq 16,0$ %. Otro asunto a tener en cuenta es el rendimiento obtenido con esta variante #1 (39 %), factor este que no favorece el proceso extractivo, ya que nuestro interés es lograr un proceso de extracción que nos permita utilizar grandes volúmenes de SCP como materias primas para ser estandarizadas a SCP al 5 %, 6 % y 15 %, por lo que decidimos aplicar la variante #2 (anexo 1).

Al aplicar la variante #2, correspondiente a los lotes FI 130002 y FI 130005*. Se obtuvieron resultados satisfactorios, ya que el porcentaje de sólidos totales fue de 14,1 % y 14,2 %, respectivamente, con un rendimiento de 53 % y 48,5 %, para ambos lotes, proceso este que favoreció el proceso extractivo teniendo en cuenta los objetivos que perseguimos en nuestro trabajo, si analizamos los resultados del porcentaje de sólidos totales, se acercan bastante a lo establecido por las especificaciones de nuestro SGC; en este caso podemos plantear que el rendimiento presenta un comportamiento aceptable de un 50 %, como promedio.

Pese a los resultados satisfactorios obtenidos en la variante #2 se decidió experimentar con la variante #3 (anexo 1). Si se observa los resultados obtenidos en la tabla 1, se puede apreciar que los sólidos totales obtenidos fue de un 8,40 %, con un rendimiento de 43,20 %, ambos inferiores al obtenido en la variante #2 y su réplica, lo que corrobora que el tiempo de agitación, utilizado en la variante #2, hasta el momento es el ideal para la obtención de las SCP con el porcentaje de sólidos totales superiores, resultado lógico por lo que se decidió descartar la variante #3, ya que como se puede apreciar el porcentaje de sólidos totales obtenidos en esta variante es inferior a los obtenidos con las variante #2, con un tiempo de agitación de 4 horas, lo que nos va indicando que el este tiempo de agitación hasta el momento es el más aceptado.

Al apreciar los resultados obtenidos en la variante #2 (anexo 1) se decidió incrementar la relación masa/volumen utilizada en esta variante, realizándose la variante #4 (anexo 1), se utilizó una proporción masa/volumen (1/6), buscando un mayor rendimiento

en el proceso extractivo, teniendo en cuenta que esta SCP es utilizada como materia prima, como mencionamos en párrafos anteriores, en la elaboración de soluciones alcohólicas de propóleos a diferentes porcentajes que se producen en nuestro centro.

Esta variante #4, que corresponde con los lotes experimentales FI 130004 y FI 130006, se pudo comprobar que los resultados también fueron positivos y favorables, en cuanto al proceso de extracción, ya que se logró sólidos totales en un rango de 12,0 y 14,3 % respectivamente, parecidos a los obtenidos en la variante #2, pero con rendimientos superiores entre 78 y 83 % y volúmenes superiores a 780 mL, resultado lógico teniendo en cuenta el volumen inicial utilizado, consideramos que este aspecto es importante debido a que se persigue obtener volúmenes superiores que permitan incrementar las diferentes producciones que se realizan en el centro.

De manera general, las propiedades organolépticas determinadas a todos los lotes experimentales para todas las variantes de extracción quedaron conformes, según lo establecido en la ESP2503 “Análisis físico-químicos para soluciones concentradas de propóleos”, donde se aprecia un líquido sin sedimentos de color pardo rojizo oscuro que puede presentar tonalidades verdes amarillentas, con un olor resinoso, alcohólico característico del propóleos, y sabor amargo.

Podemos señalar que esta variante fue seleccionada para la elaboración de los lotes experimentales a escala piloto, teniendo en cuenta no sólo la concentración de sólidos totales, sino también el volumen final y el porcentaje de rendimiento obtenido, sin descartar la variante #2, como otra de las variantes a utilizar en la obtención de las SCP.

Por todo lo planteado anteriormente, se pueden decir que los resultados obtenidos para cada variante y variables analizadas en los lotes experimentales se demostró que: el tiempo de agitación adecuado fue de 4 horas, la concentración de etanol al 96 %, fue la ideal para el proceso de extracción, y la relación masa/volumen más acertadas fueron la (1/4) y (1/6), con el porcentaje de sólidos totales, más cercano a lo planteado por la especificación EPS 2503 de nuestro SGC (≥ 16 %), correspondiente a los lotes experimentales, FI 130002, FI 130005*, FI 130004 y FI 130006**, que responden a las variantes #2 y #4 del proceso extractivo. Es importante señalar nuevamente que el parámetro rendimiento es fundamental en este proceso extractivo ya que esta SCP es utilizada como materia prima en otros proceso productivos, por lo cual un incremento de uso del etanol en el proceso de extracción del SCP favorece notablemente la producción posterior de las soluciones alcohólicas de propóleos referidas anteriormente.

En la tabla 2 se exponen los resultados obtenidos al extrapolar la variante #4, a escala piloto a un reactor de 124 L, obteniéndose los lotes FI 140001, FI 140001 y F 140002, cuyos resultados de sólidos totales oscilaron entre 8,3 y 10,7 %, resultados estos inferiores

a los obtenidos a escala de laboratorio por debajo de los establecido en la ESP2503 del SGC del centro, pero si corresponde con las normas brasileñas y cubanas que oscilan entre un 10 y un 11 %. A pesar de no obtenerse a nivel de reactor rendimientos similares a los obtenidos en los lotes experimentales a nivel de laboratorio para esta misma variante consideramos que rendimientos de 66,11, 61,11 y 63,11 %, obtenidos para estos lotes son aceptables, superiores a los obtenidos en la variante #2, en este caso hay que tener en cuenta que en estos resultados ha influido el volumen inicial utilizado del solvente, la poca evaporación del mismo producto que se encuentra en un sistema cerrado, o que permitió una extracción eficaz de los principios activos, agotándose más la masa de propóleos, de ahí los resultados inferiores de los sólidos totales.

Teniendo en cuenta los objetivos perseguidos en nuestro trabajo, consideramos que es conveniente utilizar cualquiera de las variantes #2 y #4, dependiendo de las concentraciones de soluciones alcohólicas a utilizar para el proceso productivo.

Podemos concluir que los lotes experimentales presentan una calidad final satisfactoria ya que a todos los lotes se les realizaron procesos de filtración a temperatura controlada, lográndose SCP, mucho más traslúcida, con características menos resinosas, favoreciéndose la separación de la cera contaminante disuelta en el sobrenadante durante los procesos de extracción alcohólica.

En las figuras 1 y 2 se observa el comportamiento de las variables estudiadas en los diferentes lotes experimentales obtenidos por las distintas variantes del proceso extractivos de la SCP a escala de laboratorio, relacionándose las mismas con los resultados obtenidos en el porcentaje de sólidos totales, corroborando los resultados planteados anteriormente.

En las figuras 3 y 4 se refleja el comportamiento del porcentaje de rendimiento correspondiente a los lotes experimentales elaborados a escala de laboratorio y su relación con las variables analizadas, ratificando los resultados planteados anteriormente.

En la figura 5 se presenta el resultado del porcentaje de sólidos totales obtenido para los lotes experimentales de SCP a nivel de reactor, reafirmando los resultados planteados anteriormente.

En la figura 6 se presenta el resultado del porcentaje del rendimiento obtenido para los lotes experimentales de SCP a nivel de reactor, corroborando los resultados planteados anteriormente.

En los anexos 2 y 3 se exponen los resultados obtenidos al comparar las diferentes medias aritméticas obtenidas para todos los lotes experimentales a nivel de laboratorio, donde se puede apreciar diferencias significativas con un 95 % de confianza, para cada variable analizada, entre los lotes experimentales FI 130001 y FI 130003, respecto al resto de los lotes experimentales, sobre todo si se tiene en cuenta que los volúmenes iniciales y finales de estos son diferentes, por tanto la variación en el rendimiento es evidente, lo mismo sucede con el porcentaje de los sólidos totales, aunque los resultados obtenidos al comparar los lotes obtenidos en las variantes #2 y #4, la diferencia es menor, corroborándose los resultados obtenidos y las conclusiones expuestas respecto a la variantes utilizada a escala piloto para la obtención de las SCP.

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos nos permitieron determinar las variables descritas para el proceso de extracción de las SCP a escala de laboratorio, como son el tiempo de agitación (4 horas), la concentración del solvente final (Etanol al 96 %), y la relación de masa/volumen en una proporción (1/4 y 1/6), obteniendo un porcentaje de sólidos totales entre un rango de 8,4 y 14,3 %, lográndose optimizar el proceso de extracción SCP, utilizándose cualquiera de las variantes #2 y #4, teniendo en cuenta las soluciones alcohólicas a utilizar en el proceso productivo, obteniendo propiedades organolépticas que responden a las especificaciones establecidas por nuestro Sistema de Gestión de Calidad, siendo estos resultados corroborados a través del estudio estadístico realizado.

CONFLICTO DE INTERESES

Los autores no declaran conflicto de intereses.

REFERENCIAS

1. Prodigios de las abejas: El propóleos y la jalea real. URL: http://www.sld.cu/saludvida/buscar.php?id=13094&ciduser=4&cid_topic=17.
2. J.M. Grange, R.W. Davey, Antibacterial properties of Propolis, *J. Royal Soc. Med.*, 83(3), 2-6 (1990).
3. M. Asís, “Los productos de la colmena: Composición y uso de la miel, la cera, el polen, la jalea real, el propóleo y el veneno de abejas”, Centro de información y documentación agropecuario”, Vedado, La Habana, Cuba, 1989. Cap. 4, pp. 45-52.

4. P. Walker, E. Crane, Constituents of propolis, *Apidologie*, **18**(4), 327-334 (1987).
5. L. Tolosa, E. Cañizares, Obtención, caracterización y evaluación de la actividad antimicrobiana de extractos de propóleos de Campeche, *Ars Pharmaceutica*, **43**(1-2), 187-204 (2002).
6. G.M. Sulaiman, K.W. Al Sammarrae, A.H. Ad'hiah, M. Zucchetti, R. Frapolli, E. Bello *et al.*, Chemical characterization of iraqi propolis samples and assessing their antioxidant potentials, *Food Chem. Toxicol.*, **49**(9), 2415-2421 (2011).
7. S.A. Shaheen, M.H. Zarga, I.K. Nazer, R.M. Darwish, H.I. Al-Jaber, Chemical constituents of Jordanian Propolis, *Nat. Prod. Res.*, **25**(14), 1312-1318 (2011).
8. F.M. Campos, "Estudio químico de propóleos cubanos", tesis doctoral, Instituto de Farmacia y Alimentos, Universidad de la Habana, Cuba, 2008.
9. I. Márquez, "Análisis cromatográficos y espectroscópicos de propóleos cubanos", tesis doctoral, Instituto de Farmacia y Alimentos, Universidad de la Habana, Cuba, 2007.
10. O. Cuesta, "Estudio químico de propóleos cubanos", tesis doctoral, Instituto de Farmacia y Alimentos, Universidad de la Habana, Cuba, 2001.
11. O. Cuesta, B.A. Frontena, T. Ramírez, J. Cárdenas, Polyisoprenylated benzophenones in Cuba Propolis: Biological activity of nemororosona, *Z. Naturforsch.*, **57C**(3/4), 327-378 (2002).
12. A.L. Piccinelli, M. Campo, O. Cuesta, I. Márquez, F. de Simone, L. Rastrelli, Isoflavonoids isolated from cuban propolis, *J. Agric. Food Chem.*, **53**(23), 9010-9016 (2005).
13. F.M. Campo, O. Cuesta, A. Rosado, P.R. Montes de Oca, H.I. Márquez, A.L. Piccinelli, L. Rastrelli, GC-MS determination of isoflavonoids in seven red cuban propolis samples, *J. Agric. Food Chem.*, **56**(21), 9927-9932 (2008).
14. T. Farooqui, A.A. Farooqui, Beneficial effects of propolis on human health and neurological diseases, *Frontiers in Bioscience*, **E4**, 779-793 (2012).
15. L.E. Rodríguez-Rodríguez, W. Góngora-Amores, A.I. Escalona-Arias, M.B. Miranda-Bazán, S. Batista-Suárez, Y. Bermúdez-Cisnero, Optimización de las etapas de extracción alcohólica para la obtención de Soluciones Concentradas de Propóleos, *Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm.*, **44**(1), 47-57 (2015).

16. L.E. Rodríguez-Rodríguez, W. Góngora-Amores, A. Escalona-Arias, D. Cobos-Valdés, S. Batista-Suarez, C. Loustanau-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(2), 139-147 (2015).
17. F. Adanero, "Curso para diplomado en sanidad animal", Editorial Soria, 2000.
18. F.S. Ordoñez-Checa, "Métodos de purificación del propóleos para su posterior aplicación en sanidad animal", tesis de ingeniero zootecnista, Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Ecuador, 2012.
19. Método Pichansky: maceración de propóleos en alcohol al 70%, "Formulario Nacional Fitofármacos y Apifármacos", Ministerio de Salud Pública y la Dirección Nacional de Farmacias, Editorial de Ciencias Médicas, La Habana, 2010.
20. Patente Cubana 21875: "Método de obtención del propóleos", (Índice de clasificación internacional A 61K35/64). Formulario Nacional Fitofármacos y Apifármacos, Ministerio de Salud Pública y la Dirección Nacional de Farmacias, Editorial de Ciencias Médicas, La Habana, 2010.
21. "Formulario Nacional, Fitofármacos y Apifármacos", Ministerio de Salud Pública, Dirección Nacional de Farmacias, Editorial Ciencias Médicas, La Habana, 2010.
22. PNO 2.049, "Preparación de la solución concentrada de propóleos", 2a edición, Departamento de Aseguramiento de Calidad, Centro de Inmunología y Biopreparados, Holguín, Cuba, 2012.
23. PNO 1.017 "Análisis fisicoquímico de propóleos", Departamento de Aseguramiento de Calidad, Centro de Inmunología y Biopreparados, Holguín, Cuba, 2012.
24. EPS-2503, "Solución alcohólica de propóleos", 2a edición, Departamento de Aseguramiento de Calidad, Centro de Inmunología y Biopreparados, Holguín, Cuba, 2011.
25. ESP-0005, "Propóleos", 2a edición, Departamento de Aseguramiento de Calidad, Centro de Inmunología y Biopreparados, Holguín, Cuba, 2001.
26. ESP-0010, "Etanol", Departamento de Aseguramiento de Calidad, Centro de Inmunología y Biopreparados, Holguín, 2002.
27. RC 2.014, "Registro Maestro de preparación de la solución de propóleos", Departamento de Aseguramiento de Calidad, Centro de Inmunología y Biopreparados, Holguín, Cuba, 2014.

ANEXO 1

VARIANTES UTILIZADAS EN LOS PROCESOS DE OBTENCIÓN DE LA SOLUCIÓN CONCENTRADA DE PROPÓLEOS

Variante #1: en este caso se utilizó una relación masa/volumen (1/4), con una concentración de Etanol al 70% y un tiempo de agitación de 4 horas.

Primera extracción:

Propóleos en bruto	250 g
Alcohol al 70% + filtrado baja concentración c.s.p.	1000 mL

Siguientes extracciones:

Propóleos residual
Alcohol 70% (de acuerdo a los cálculos de las concentraciones).

Siguientes extracciones:

Propóleos residual
Alcohol 70 % (de acuerdo a los cálculos de las concentraciones).

Variante #2: en este caso se utilizó una relación masa/volumen (1/4), con una concentración de Etanol al 96 % y un tiempo de agitación de 4 horas.

Primera extracción:

Propóleos en bruto	250 g
Alcohol al 96% + filtrado baja concentración c.s.p.	1000 mL

Siguientes extracciones:

Propóleos residual
Alcohol 96% (de acuerdo a los cálculos de las concentraciones)

Variante #3: en este caso se utilizó una relación masa/volumen (1/4), con una concentración de Etanol al 96 % y un tiempo de agitación de 2 horas.

Primera extracción:

Propóleos en bruto	250 g
Alcohol al 96% + filtrado baja concentración c.s.p.	1000 mL

Siguientes extracciones:

Propóleos residual

Alcohol 96% (de acuerdo a los cálculos de las concentraciones)

Variante #4: en este caso se utilizó una relación masa/volumen (1/6), con una concentración de Etanol al 96 % y un tiempo de agitación de 4 horas.

Primera extracción:

Propóleos en bruto	250 g
Alcohol al 96% + filtrado baja concentración c.s.p.	1500 mL

Siguientes extracciones:

Propóleos residual

Alcohol 96% (de acuerdo a los cálculos de las concentraciones).

ANEXO 2

Resumen de la comparación de las medias aritméticas del porcentaje de sólidos totales entre los diferentes lotes experimentales de SCP obtenidos por las diferentes variantes a nivel de laboratorio.

Tabla A2.1. Comparación de medias aritméticas del porcentaje sólidos totales obtenidos entre los lotes experimentales de SCP. Variante #1 (Lote FI 130001), variante #2 (Lotes FI 130002 y 5) y variante #3 (Lote FI 130003).

Diferencia (Df)	7,25
% Confianza	95
<i>t</i>	4,831
<i>P</i>	0,0403

Tabla A2.2. Comparación de medias aritméticas del porcentaje sólidos totales obtenidos entre los lotes experimentales de SCP. Variante #1 (Lote FI 130001), variante #3 (Lote FI 130003) y variante #4 (Lote FI 130004 y 6).

Diferencia (Df)	6,25
% Confianza	95
<i>t</i>	3,307
<i>P</i>	0,0806

Tabla A2.3. Comparación de medias aritméticas del porcentaje sólidos totales obtenidos entre los lotes experimentales de SCP. Variante #2 (Lotes FI 130002 y 5) y variante # 4 (Lote FI 130004 y 6).

Diferencia (Df)	1
% Confianza	95
<i>t</i>	0,869
<i>P</i>	0,4766

ANEXO 3

Resumen de la comparación de las medias aritméticas del porcentaje rendimiento entre los diferentes lotes experimentales de SCP obtenidos por las diferentes variantes a nivel de laboratorio.

Tabla A3.1. Comparación de medias aritméticas del porcentaje rendimiento obtenidos entre los lotes experimentales de SCP. Variante #1 (Lote FI 130001), variante #2 (Lotes FI 130002 y 5) y variante #3 (Lote FI 130003)

Diferencia (Df)	9,65
% Confianza	95
<i>t</i>	2,821
<i>P</i>	0,1060

Tabla A3.2. Comparación de medias aritméticas del porcentaje rendimiento obtenidos entre los lotes experimentales de SCP. Variante #1 (Lote FI 130001), variante #3 (Lote FI 130003) y variante #4 (Lote FI 130004 y 6).

Diferencia (Df)	12,55
% Confianza	95
<i>t</i>	4,684
<i>P</i>	0,0427

Tabla A3.3. Comparación de medias aritméticas del porcentaje rendimiento obtenidos entre los lotes experimentales de SCP. Variante #2 (Lotes FI 130002 y 5) y variante # 4 (Lote FI 130004 y 6).

Diferencia (Df)	2,00
% Confianza	95
<i>t</i>	1,036
<i>P</i>	0,4090

CÓMO CITAR ESTE ARTÍCULO

L.E. Rodríguez-Rodríguez, A.R. Miranda-Cruz, A. Escalona-Arias, W. Góngora-Amores, S. Batista-Suárez, D. Cobos-Valdés, Investigación básica experimental para la definición de los parámetros críticos en el proceso de obtención de soluciones concentradas de propóleos (SCP), *Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm.*, **45**(2), 179-200 (2016).

Synthesis, characterization and antibacterial screening of some Schiff bases derived from pyrazole and 4-amino antipyrine

Shipra Baluja¹, Sumitra Chanda²

¹Department of Chemistry, Saurashtra University, Rajkot-360 005, Gujarat, India

E-mail: shipra_baluja@rediffmail.com

²Department of Biosciences, Saurashtra University, Rajkot-360 005, Gujarat, India

Received: September 22, 2015

Accepted: April 7, 2016

SUMMARY

Some Schiff bases of pyrazole and 4-amino antipyrine have been synthesized. The antibacterial screening of these synthesized compounds was done in dimethyl formamide against four Gram positive bacteria viz. *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* and *Micrococcus luteus*, and three Gram negative bacteria viz. *Proteus mirabilis*, *Escherichia coli* and *Klebsiella aerogenes*. It is observed that in comparison to Schiff bases of 4-amino antipyrine, pyrazole Schiff bases are better for inhibition for these selected Gram positive and Gram negative bacterial strains.

Keywords: Pyrazole, 4-amino antipyrine, Schiff bases, dimethyl formamide, antibacterial activity.

RESUMEN

Síntesis, caracterización y evaluación antibacteriana de algunas bases de Schiff derivadas de pirazol y 4-amino antipirina

Se sintetizaron algunas bases de Schiff a partir de pirazol y 4-amino antipirina. La evaluación de la actividad antibacteriana de estos compuestos en dimetil formamida se realizó frente a cuatro bacterias Gram positivas, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* y *Micrococcus luteus*, y frente a tres bacterias Gram negativas, *Proteus mirabilis*, *Escherichia coli* y *Klebsiella aerogenes*. Se observó

mejor inhibición bacteriana frente a las diferentes cepas para las bases de Schiff basadas en pirazol comparadas con aquellas basadas en 4-amino antipirina.

Palabras clave: Pirazol, 4-amino antipirina, bases de Schiff, dimetil formamida, actividad antibacteriana.

INTRODUCTION

Schiff's bases are an important class of organic compounds having a wide variety of applications in many fields such as analytical, biological and inorganic chemistry [1-5]. Some of these compounds act as corrosion inhibitors [6] and are used as catalysts in polymer [7-8] and dyes [9] industries. Further, Schiff bases have gained importance in medicinal and pharmaceutical fields due to a broad spectrum of biological activities like antimicrobial [10-11], antifungal [12-13], antiviral [14], anti-inflammatory [15-16], analgesic [17-18], anticonvulsant [19], antitubercular [20], anticancer [21], antioxidant [22-23], anthelmintic [24], antimalarial [25-26] and so forth.

In continuation of our previous research [27-28], in the present work, some new Schiff bases have been synthesized having pyrazole and 4-amino antipyrine moieties and their structure were confirmed by IR, NMR and mass spectral data. The screening of these compounds was also done to study their antibacterial properties in dimethyl formamide.

EXPERIMENTAL

Synthesis of pyrazole Schiff bases

Synthesis of (1E)-1-(4-nitrophenyl)ethanone phenylhydrazone

Equimolar solution of phenyl hydrazine and p-nitro phenyl acetophenone in absolute ethanol was refluxed in water bath for 2 hours using glacial acetic acid as catalysis. The crude product was isolated and was crystallized from absolute alcohol.

Synthesis of 3-(4-nitrophenyl)-1-phenyl-1H-pyrazole-4-carbaldehyde

(1E)-1-(4-nitro phenyl) ethanone phenyl hydrazone (0.01M) was added to Vilsmyer-Haack reagent (prepared by drop wise addition of 3 ml POCl₃ in ice cooled 25 ml DMF) and was refluxed for 5 hours. The reaction mixture was poured into ice followed by neutralization using sodium bicarbonate. The crude product was isolated and crystallized from ethanol.

Synthesis of Schiff bases

In an ethanolic solution of 3-(4-nitro phenyl)-5-phenyl-4*H*-pyrazole-4-carbaldehyde and different aromatic amines, 2-3 drops of glacial acetic acid was added and the reaction mixture was refluxed for 10 hours. The resulting solution was cooled to room temperature and was poured in crushed ice with constant stirring. The product was filtered and washed with sodium bisulfate solution to remove the unreacted aldehyde. The crude product was crystallized from methanol and dried.

The synthesized Schiff bases are:

1. SA-1: (E)-3-(4-nitrophenyl)-1-phenyl-4-((2-phenylhydrazono)methyl)-1H-pyrazole
2. SA-2: (E)-4-methyl-N-((3-(4-nitrophenyl)-1-phenyl-1H-pyrazol-4-yl)methylene)aniline
3. SA-3: (E)-4-nitro-N-((3-(4-nitrophenyl)-1-phenyl-1H-pyrazol-4-yl)methylene)aniline
4. SA-4: (E)-4-methoxy-N-((3-(4-nitrophenyl)-1-phenyl-1H-pyrazol-4-yl)methylene)aniline
5. SA-5: (E)-3-chloro-4-fluoro-N-((3-(4-nitrophenyl)-1-phenyl-1H-pyrazol-4-yl)methylene)aniline
6. SA-6: (E)-4-chloro-N-((3-(4-nitrophenyl)-1-phenyl-1H-pyrazol-4-yl)methylene)aniline
7. SA-7: (E)-4-fluoro-N-((3-(4-nitrophenyl)-1-phenyl-1H-pyrazol-4-yl)methylene)aniline
8. SA-8: (E)-2,5-dichloro-N-((3-(4-nitrophenyl)-1-phenyl-1H-pyrazol-4-yl)methylene)aniline
9. SA-9: (E)-2-(((3-(4-nitrophenyl)-1-phenyl-1H-pyrazol-4-yl)methylene)amino)phenol.

Synthesis of Schiff base from 4-amino antipyrine

Equimolar amount of different aldehydes and 4-amino anti pyridine was dissolved in 30 ml methanol. 0.1 mole of 4-amino antipyrine and few drops of glacial acidic acid were added in this solution and the mixture was refluxed for 12-14 hours at 80 °C-85 °C in water bath.

The resulting solution was cooled to room temperature and then poured in crushed ice with constant stirring. The product was filtered and washed with sodium bisulfate solution to remove the unreacted aldehyde. The crude product was crystallized from methanol and dried.

The following Schiff bases have been synthesized from 4-amino antipyrine:

1. SB-1: (E)-4-((4-(dimethylamino)benzylidene)amino)1,5-dimethyl-2-phenyl-1H-pyrazol-3(2H)-one
2. SB-2: (E)-4-((4-chlorobenzylidene)amino)1,5-dimethyl-2-phenyl-1H-pyrazol-3(2H)-one
3. SB-3: (E)-4-((4-fluorobenzylidene)amino)1,5-dimethyl-2-phenyl-1H-pyrazol-3(2H)-one
4. SB-4: (E)-1,5-dimethyl-4-((2-nitrobenzylidene)amino)-2-phenyl-1H-pyrazol-3(2H)-one
5. SB-5: (E)-1,5-dimethyl-4-((3-nitrobenzylidene)amino)-2-phenyl-1H-pyrazol-3(2H)-one
6. SB-6: (E)-4-((4-hydroxybenzylidene)amino)1,5-dimethyl-2-phenyl-1H-pyrazol-3(2H)-one
7. SB-7: (E)-4-((2-chlorobenzylidene)amino)1,5-dimethyl-2-phenyl-1H-pyrazol-3(2H)-one.

All these compounds were synthesized according to the reaction schemes given in figures 1 and 2.

The physical parameters such as molecular formula, molecular weight, melting point, percentage yields, and R_f values along with the solvent system of all these synthesized compounds are given in tables 1 and 2 respectively.

The IR spectra (KBr pellets) were scanned on IR (SHIMADZU-FTIR-8400) over the frequency range from 4000-400 cm^{-1} . ^1H NMR spectra were scanned on Bruker Spectrometer (400 MHz) by using deuterated DMSO as a solvent. The Mass spectra were scanned on GCMS-SHIMADZU-QP2010.

Antibacterial activity

Test microorganisms

The synthesized compounds were tested for its antibacterial activity against four Gram positive bacteria viz. *Bacillus cereus* ATCC11778, *Staphylococcus aureus* ATCC 29737, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 and *Micrococcus luteus* ATCC10240, and three Gram negative bacteria viz. *Proteus mirabilis* NCIM2241, *Escherichia coli* ATCC25922 and *Klebsiella aerogenes* NCTC418. The microorganisms were obtained from National Chemical Laboratory (NCL), Pune, India. Microorganisms were maintained at 4 °C on nutrient agar slants.

Figure 1. Reaction scheme for pyrazole Schiff bases

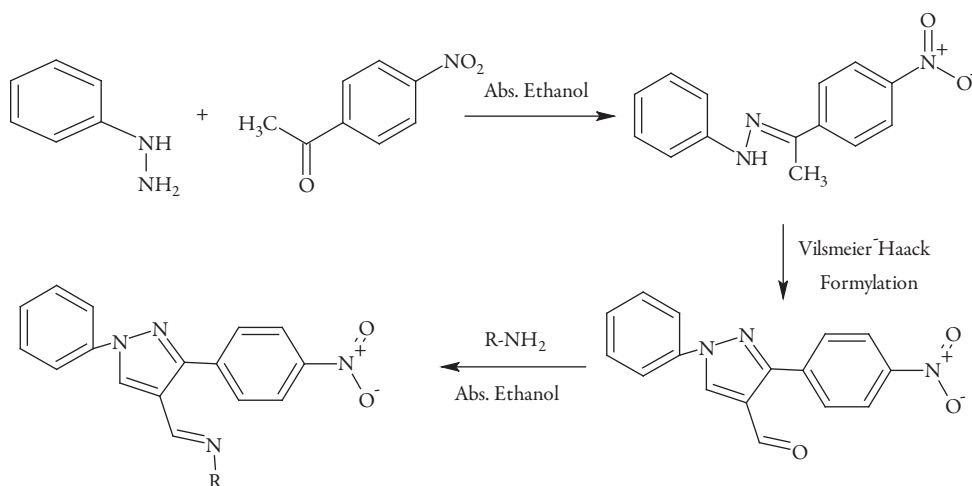


Figure 2. Reaction scheme for 4-amino antipyrine Schiff bases

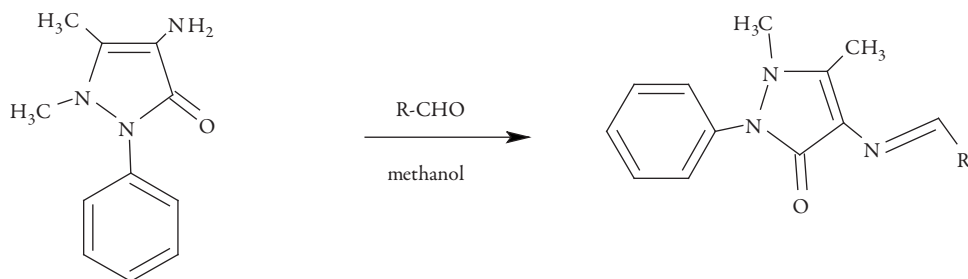


Table 1. Physical constants of pyrazole Schiff bases.

Serial No.	Compound code	R	Molecular formula	Mol. Wt. (g/mol)	R _f * value	M.P. (°C)	Yield (%)
1.	SA-1	-NH-C ₆ H ₅	C ₂₂ H ₁₇ N ₅ O ₂	383	0.67	266	65
2.	SA-2	4-CH ₃ -C ₆ H ₄	C ₂₃ H ₁₈ N ₄ O ₂	382	0.54	218	69
3.	SA-3	4-NO ₂ -C ₆ H ₄	C ₂₂ H ₁₅ N ₅ O ₄	413	0.62	246	65
3.	SA-4	3-OCH ₃ -C ₆ H ₄	C ₂₃ H ₁₈ N ₄ O ₃	398	0.54	258	78
4.	SA-5	4-F,3-Cl-C ₆ H ₃	C ₂₂ H ₁₄ ClFN ₄ O ₂	420	0.47	243	65
5.	SA-6	4-Cl-C ₆ H ₄	C ₂₂ H ₁₅ ClN ₄ O ₂	402	0.55	198	70
6.	SA-7	4-F-C ₆ H ₄	C ₂₂ H ₁₅ FN ₄ O ₂	386	0.60	268	72
7.	SA-8	2,5-di Cl-C ₆ H ₃	C ₂₂ H ₁₄ Cl ₂ N ₄ O ₂	436	0.46	283	68
8.	SA-9	2-OH-C ₆ H ₄	C ₂₂ H ₁₆ N ₄ O ₃	384	0.47	256	76

*TLC solvent system: Hexane:Ethyl acetate- 7.0:3.0

Table 2. Physical constants of 4-amino antipyrine Schiff bases.

Serial No.	Compound code	R	Molecular formula	Mol. Wt. (g/mol)	R _f * value	M.P. (°C)	Yield (%)
1.	SB-1	4-N(CH ₃) ₂ -C ₆ H ₄	C ₂₀ H ₂₂ N ₄ O	334	0.42	218	65
2.	SB-2	4-Cl-C ₆ H ₄	C ₁₈ H ₁₆ ClN ₃ O	325	0.35	258	63
3.	SB-3	4-F-C ₆ H ₄	C ₁₈ H ₁₆ FN ₃ O	309	0.48	230	64
3.	SB-4	2-NO ₂ -C ₆ H ₄	C ₁₈ H ₁₆ N ₄ O ₃	336	0.45	210	73
4.	SB-5	3-NO ₂ -C ₆ H ₄	C ₁₈ H ₁₆ N ₄ O ₃	336	0.28	205	68
5.	SB-6	4-OH-C ₆ H ₄	C ₁₈ H ₁₇ N ₃ O ₂	307	0.34	202	69
6.	SB-7	2-Cl-C ₆ H ₄	C ₁₈ H ₁₆ ClN ₃ O	325	0.56	210	78

*TLC solvent system: Hexane:Ethyl acetate- 8.0:2.0

Preparation of the test compound

For all the compounds, solutions were prepared at a concentration of 0.2 mg/ml in DMF.

Preparation of the plates and microbiological assay

The antibacterial evaluation was done by agar well diffusion method [29] using Mueller Hinton agar No. 2 as the nutrient medium. The agar well diffusion method was preferred to be used in this study since it was found to be better than the disc diffusion method as suggested by Essawi *et al.* [30]. The bacterial strains were activated by

inoculating a loop full of test strain in 25 ml of N-broth and the same was incubated for 24 hours in an incubator at 37 °C. 0.2 ml of the activated strain was inoculated in Mueller Hinton agar.

Mueller Hinton agar kept at 45 °C was then poured in the Petri dishes and allowed to solidify. After solidification of the media, 0.85 cm ditch was made in the plates using a sterile cork borer and these were completely filled with the test solution. The plates were incubated for 24 h at 37 °C. The mean value obtained for the three wells was used to calculate the zone of growth inhibition of each sample. The controls were maintained for each bacterial strain. The inhibition zone formed by these compounds against the particular test bacterial strain determined the antibacterial activities of the synthetic compounds. The observed activities are also compared with well known antibiotics.

RESULTS AND DISCUSSION

The physical parameters all the synthesized compounds are given in tables 1 and 2.

Spectral data

SA-1: (E)-3-(4-nitrophenyl)-1-phenyl-4-((2-phenylhydrazono)methyl)-1H-pyrazole

IR (cm^{-1} , KBr): 1543 (C=C str.), 1598 (C=N str. (Schiff base), 1543 (C=N str., (pyrazole moiety), 1256 (C-N str.), 961 (N-N str.), 1256 (N-O str.).

1H NMR (DMSO- d_6) δ (ppm): 6.91- 7.02 (2H, doublet, Ar-H), 7.29- 7.34 (2H, doublet, Ar-H), 7.61-7.62 (2H, multiplet, Ar-H), 7.42-7.59 (9 H, multiplet, Ar-H), 7.63 (1 H, singlet, Ar-H), 8.85 (1H, singlet, -N=CH).

MS: (m/z) = 383

SA-2: (E)-4-methyl-N-((3-(4-nitrophenyl)-1-phenyl-1H-pyrazol-4-yl)methylene) aniline

IR (cm^{-1} , KBr): 1537 (C=C str.), 1620 (C=N str. (Schiff base), 1598 (C=N str., (pyrazole moiety), 1256 (C-N str.), 961 (N-N str.), 1288 (N-O str.), 2922 (C-H str. (alkane).

1H NMR (DMSO- d_6) δ (ppm): 3.75 (3H, singlet, C-CH₃), 6.86-6.92 (2H, doublet, Ar-H), 7.32- 7.47 (2H, doublet, Ar-H), 7.51-7.63 (9 H, multiplet, Ar-H), 7.74 (1 H, singlet, Ar-H), 8.84 (1H, singlet, -N=CH).

MS: (m/z) = 382

SA-3: (*E*)-4-nitro-*N*-((3-(4-nitrophenyl)-1-phenyl-1*H*-pyrazol-4-yl)methylene)aniline

IR (cm^{-1} , *KBr*): 1508 (C=C str.), 1635 (C=N str. (Schiff base), 1635 (C=N str., (pyrazole moiety), 1242 (C-N str.), 965 (N-N str.), 1339 (N-O str.).

1H NMR (*DMSO-d*₆) δ (ppm): 6.64-6.71 (2H, doublet, Ar-H), 7.26- 7.32 (2H, doublet, Ar-H), 7.63-7.78 (9 H, multiplet, Ar-H), 7.95 (1 H, singlet, Ar-H), 8.67 (1H, singlet, -N=CH).

MS: (m/z) = 413

SA-4: (*E*)-4-methoxy-*N*-((3-(4-nitrophenyl)-1-phenyl-1*H*-pyrazol-4-yl)methylene)aniline

IR (cm^{-1} , *KBr*): 1504 (C=C str.), 1627 (C=N str. (Schiff base), 1596 (C=N str., (pyrazole moiety), 1242 (C-N str.), 961 (N-N str.), 1338 (N-O str.), 1029 (C-O-C str. Ether).

1H NMR (*DMSO-d*₆) δ (ppm): 3.85 (3H, singlet, C-CH₃), 6.94-6.97 (2H, doublet, Ar-H), 7.23- 7.28 (2H, doublet, Ar-H), 7.39-7.55 (9 H, multiplet, Ar-H), 7.56 (1 H, singlet, Ar-H), 8.74 (1H, singlet, -N=CH).

MS: (m/z) = 398

SA-5: (*E*)-3-chloro-4-fluoro-*N*-((3-(4-nitrophenyl)-1-phenyl-1*H*-pyrazol-4-yl)methylene)aniline

IR (cm^{-1} , *KBr*): 1502 (C=C str.), 1598 (C=N str. (Schiff base), 1597 (C=N str., (pyrazole moiety), 1226 (C-N str.), 961 (N-N str.), 1340 (N-O str.), 1049 (C-F str.), 754 (C-Cl str.).

1H NMR (*DMSO-d*₆) δ (ppm): 6.62-6.66 (1H, doublet, Ar-H), 7.07- 7.12 (1 H, triplet, Ar-H), 7.10-8.02 (10 H, multiplet, Ar-H), 8.37 (1 H, singlet, Ar-H), 8.70 (1H, singlet, -N=CH).

MS: (m/z) = 420

SA-6: (*E*)-4-chloro-*N*-((3-(4-nitrophenyl)-1-phenyl-1*H*-pyrazol-4-yl)methylene)aniline

IR (cm^{-1} , *KBr*): 1540 (C=C str.), 1598 (C=N str. (Schiff base), 1635 (C=N str., (pyrazole moiety), 1336 (C-N str.), 960 (N-N str.), 1387 (N-O str.), 754 (C-Cl str.).

¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ(ppm): 6.52-6.62 (2H, doublet, Ar-H), 7.01- 7.12 (2H, doublet, Ar-H), 7.33-7.52 (9 H, multiplet, Ar-H), 7.82 (1 H, singlet, Ar-H), 8.84 (1H, singlet, -N=CH).

MS: (m/z) = 402

SA-7: (*E*)-4-fluoro-*N*-((3-(4-nitrophenyl)-1-phenyl-1*H*-pyrazol-4-yl)methylene)aniline

IR (cm⁻¹, KBr): 1500 (C=C str.), 1599 (C=N str. (Schiff base), 1637 (C=N str., (pyrazole moiety), 1333 (C-N str.), 961 (N-N str.), 1230 (N-O str.), 1079 (C-F str.).

¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ(ppm): 6.45-6.53 (2H, doublet, Ar-H), 7.14- 7.26 (2H, doublet, Ar-H), 7.36-7.62 (9 H, multiplet, Ar-H), 7.96 (1 H, singlet, Ar-H), 8.85 (1H, singlet, -N=CH).

MS: (m/z) = 386

SA-8: (*E*)-2,5-dichloro-*N*-((3-(4-nitrophenyl)-1-phenyl-1*H*-pyrazol-4-yl)methylene)aniline

IR (cm⁻¹, KBr): 1521 (C=C str.), 1590 (C=N str. (Schiff base), 1628 (C=N str., (pyrazole moiety), 1328 (C-N str.), 962 (N-N str.), 1248 (N-O str.), 751 (C-Cl str.).

¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ(ppm): 6.43-6.51 (1H, doublet, Ar-H), 7.14- 7.20 (1 H, triplet, Ar-H), 7.35-8.24 (10 H, multiplet, Ar-H), 8.28 (1 H, singlet, Ar-H), 8.96 (1H, singlet, -N=CH).

MS: (m/z) = 436

SA-9: (*E*)-2-(((3-(4-nitrophenyl)-1-phenyl-1*H*-pyrazol-4-yl)methylene)amino)phenol

IR (cm⁻¹, KBr): 1515 (C=C str.), 1585 (C=N str. (Schiff base), 1634 (C=N str., (pyrazole moiety), 1332 (C-N str.), 960 (N-N str.), 1241 (N-O str.).

¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ(ppm): 6.42-6.56 (2H, doublet, Ar-H), 7.08- 7.14 (2H, doublet, Ar-H), 7.25-7.63 (9 H, multiplet, Ar-H), 7.68 (1 H, singlet, Ar-H), 7.92 (1H, singlet, -OH), 8.89 (1H, singlet, -N=CH).

MS: (m/z) = 384

SB-1: (*E*)-4-((4-(dimethylamino)benzylidene)amino)1,5-dimethyl-2-phenyl-1*H*-pyrazol-3(2H)-one

IR (cm^{-1} , *KBr*): 2930 (-C-H str. (asym.)), 2804 (-C-H str. (sym.)), 1582 (C=C str.) 1648 (C=N str.), 1648 (C=O str.), 1582 (C=N str.), 1290 (C-N str.), 973 (N-N str.).

¹H NMR (*DMSO-d₆*) δ (ppm): 2.11-2.35 (6H, singlet, C-CH₃), 2.56 (3H, singlet, C-CH₃), 3.25 (3H, singlet, N-CH₃), 7.05- 7.10 (2H, triplet, Ar-H), 7.35-7.39 (1H, triplet, Ar-H), 7.47-7.94 (6H, multiplet, Ar-H), 9.85 (1H, singlet, N=CH-).

MS: (m/z) = 334

SB-2: (*E*)-4-((4-chlorobenzylidene)amino)1,5-dimethyl-2-phenyl-1*H*-pyrazol-3(2*H*)-one

IR (cm^{-1} , *KBr*): 2939 (-C-H str. (asym.)), 2850 (-C-H str. (sym.)), 1571 (C=C str.) 1571 (C=N str.), 1650 (C=O str.), 1593 (C=N str.), 1290 (C-N str.), 739 (C-Cl str.).

¹H NMR (*DMSO-d₆*) δ (ppm): **¹H NMR** (*DMSO-d₆*) δ (ppm) : 2.32 (3H, singlet, C-CH₃), 3.22 (3H, singlet, N-CH₃), 6.91- 6.96 (2H, triplet, Ar-H), 7.20-7.29 (1H, triplet, Ar-H), 7.35-7.55 (6H, multiplet, Ar-H), 9.74 (1H, singlet, N=CH-).

MS: (m/z) = 325

SB-3: (*E*)-4-((4-fluorobenzylidene)amino)1,5-dimethyl-2-phenyl-1*H*-pyrazol-3(2*H*)-one

IR (cm^{-1} , *KBr*): 2950 (-C-H str. (asym.)), 2830 (-C-H str. (sym.)), 1568 (C=C str.) 1597 (C=N str.), 1651 (C=O str.), 1597 (C=N str.), 1454 (C-H str.), 1221 (C-F str.).

¹H NMR (*DMSO-d₆*) δ (ppm): 2.47 (3H, singlet, C-CH₃), 3.15 (3H, singlet, N-CH₃), 7.07- 7.11 (2H, triplet, Ar-H), 7.30-7.34 (1H, triplet, Ar-H), 7.38-7.85 (6H, multiplet, Ar-H), 9.70 (1H, singlet, N=CH-).

MS: (m/z) = 309

SB-4: (*E*)-1,5-dimethyl-4-((2-nitrobenzylidene)amino)-2-phenyl-1*H*-pyrazol-3(2*H*)-one

IR (cm^{-1} , *KBr*): 2945 (-C-H str. (asym.)), 2835 (-C-H str. (sym.)), 1568 (C=C str.) 1591 (C=N str.), 1647 (C=O str.), 1591 (C=N str.), 1381 (N-O str.).

¹H NMR (*DMSO-d₆*) δ (ppm): 2.48 (3H, singlet, C-CH₃), 3.21 (3H, singlet, N-CH₃), 7.28- 7.32 (2H, triplet, Ar-H), 7.38-7.40 (1H, triplet, Ar-H), 7.17-7.46 (6H, multiplet, Ar-H), 9.90 (1H, singlet, N=CH-).

MS: (m/z) = 336

SB-5: (*E*)-1,5-dimethyl-4-((3-nitrobenzylidene)amino)-2-phenyl-1*H*-pyrazol-3(2*H*)-one

IR (cm^{-1} , *KBr*): 2942 (-C-H str. (asym.)), 2815 (-C-H str. (sym.)), 1584 (C=C str.) 1599 (C=N str.), 1662 (C=O str.), 1590 (C=N str.), 1372 (N-O str.).

¹H NMR (*DMSO-d*₆) δ (*ppm*): **¹H NMR** (*DMSO-d*₆) δ (*ppm*) : 2.41 (3H, singlet, C-CH₃), 3.07 (3H, singlet, N-CH₃), 6.71- 6.80 (2H, triplet, Ar-H), 7.21-7.39 (1H, triplet, Ar-H), 7.52-7.80 (6H, multiplet, Ar-H), 9.99 (1H, singlet, N=CH-).

MS: (*m/z*) = 336

SB-6: (*E*)-4-((4-hydroxybenzylidene)amino)1,5-dimethyl-2-phenyl-1*H*-pyrazol-3(2*H*)-one

IR (cm^{-1} , *KBr*): 2945 (-C-H str. (asym.)), 2835 (-C-H str. (sym.)), 1584 (C=C str.) 1585 (C=N str.), 1646 (C=O str.), 3350 (O-H str.).

¹H NMR (*DMSO-d*₆) δ (*ppm*): **¹H NMR** (*DMSO-d*₆) δ (*ppm*) : 2.46 (3H, singlet, C-CH₃), 3.11 (3H, singlet, N-CH₃), 6.85- 6.87 (2H, triplet, Ar-H), 7.30-7.32 (1H, triplet, Ar-H), 7.38-7.70 (6H, multiplet, Ar-H), 9.21 (1H, singlet, -OH), 9.85 (1H, singlet, N=CH-).

MS: (*m/z*) = 307

SB-7: (*E*)-4-((2-chlorobenzylidene)amino)1,5-dimethyl-2-phenyl-1*H*-pyrazol-3(2*H*)-one

IR (cm^{-1} , *KBr*): 2940 (-C-H str. (asym.)), 2835 (-C-H str. (sym.)), 1555 (C=C str.) 1588 (C=N str.), 1650 (C=O str.), 1588 (C=N str.), 750 (C-Cl str.).

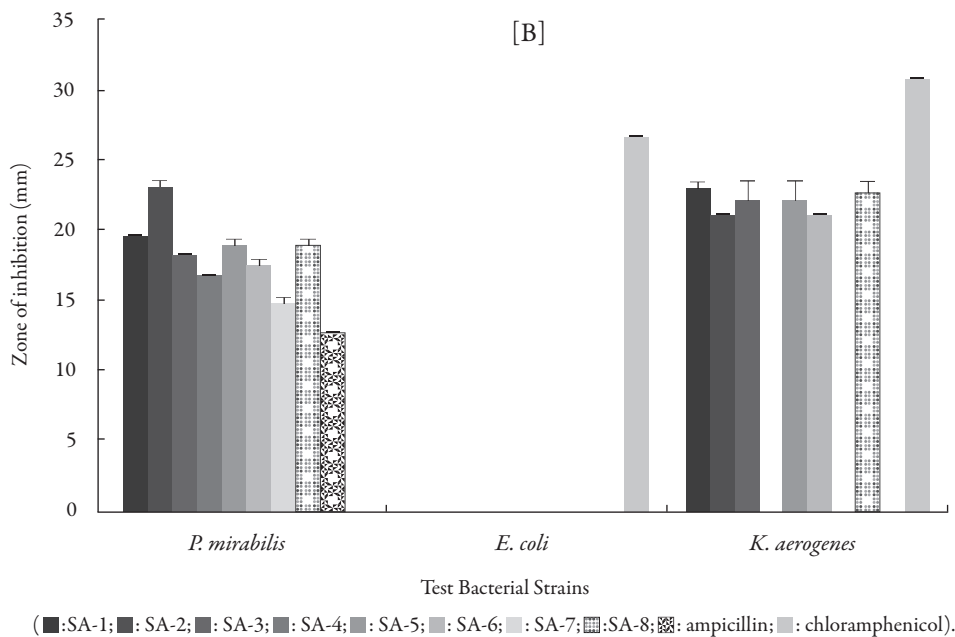
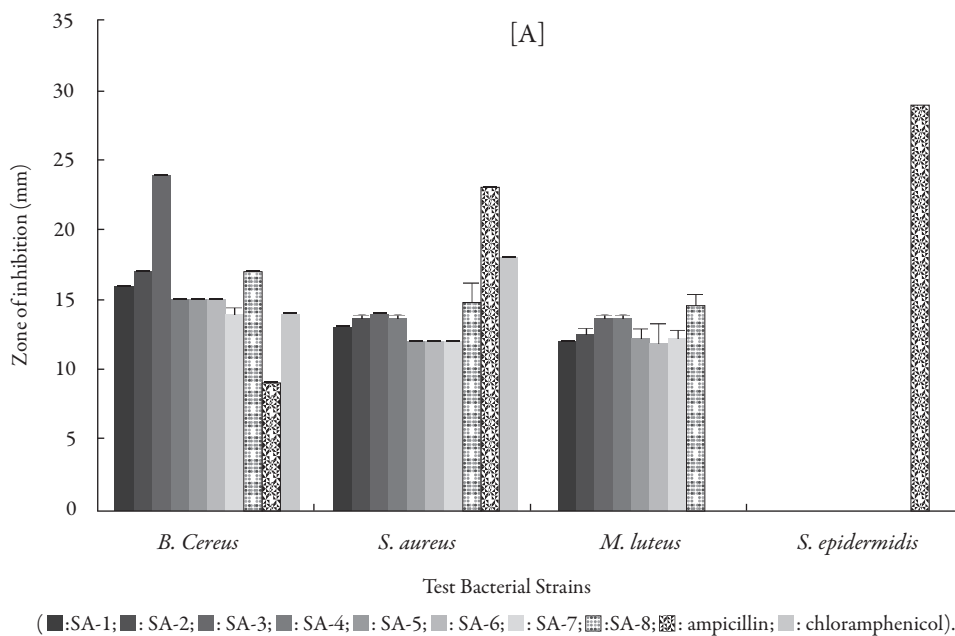
¹H NMR (*DMSO-d*₆) δ (*ppm*): 2.389 (3H, singlet, -CH₃), 1.713-2.796 (4H, multiplet, C-H), 6.170 (1H, singlet, -CH), 7.196-7.936 (8H, multiplet -CH), 10.201 (1H, singlet, -NH).

MS: (*m/z*) = 307

Antibacterial activity

The inhibition zone of pyrazole Schiff bases against different Gram positive and Gram negative bacteria are given in Figure 3.

Figure 3. Antibacterial activity of pyrazole Schiff bases against [A] Gram positive [B] Gram negative bacteria.



It is evident from figure 3 [A] that SA-3 and SA-8 exhibited maximum inhibition against all the selected Gram positive bacteria except *S. epidermidis*. Against *B. cereus*, minimum inhibition is exhibited by SA-7 while other compounds show almost equal inhibition. Against *S. aureus*, SA-3 and SA-8 shows maximum inhibition followed by SA-2 and SA-4. Minimum inhibition is exhibited by SA-1, SA-5, SA-6 and SA-7. Against *M. luteus* also, SA-8 showed maximum inhibition followed by SA-3 and SA-4. SA-6 exhibited minimum inhibition. For *S. epidermidis*, not a single compound showed inhibition. Thus, *S. epidermidis* is the most resistant strain.

Thus, for the studied Gram positive bacteria, different compounds behave differently. All the compounds have the same common moiety but different substituents as side chain as shown in table 1. SA-3 and SA-8, which exhibited maximum inhibition, contain 4-nitro and 2, 5-dichloro aniline respectively as side chain. Thus, these two groups are the most effective substituent groups for the selected Gram positive bacteria.

Figure 3 [B] shows that against *P. mirabilis*, SA-2 shows maximum inhibition followed by SA-1, SA-5 and SA-8 and SA-7 shows minimum activity. SA-2 contains 4-methyl aniline side chain, which is found to enhance the inhibition whereas 4-fluoro aniline (as in SA-7) is least effective. Against *E. coli*, none of the compound exhibited activity indicating thereby that it is the most resistant bacteria strain.

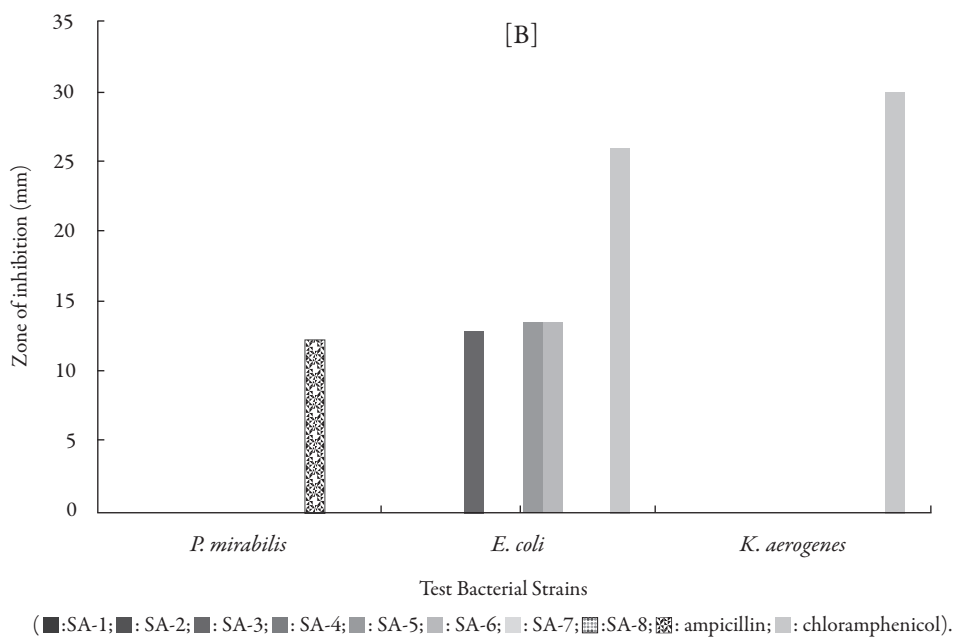
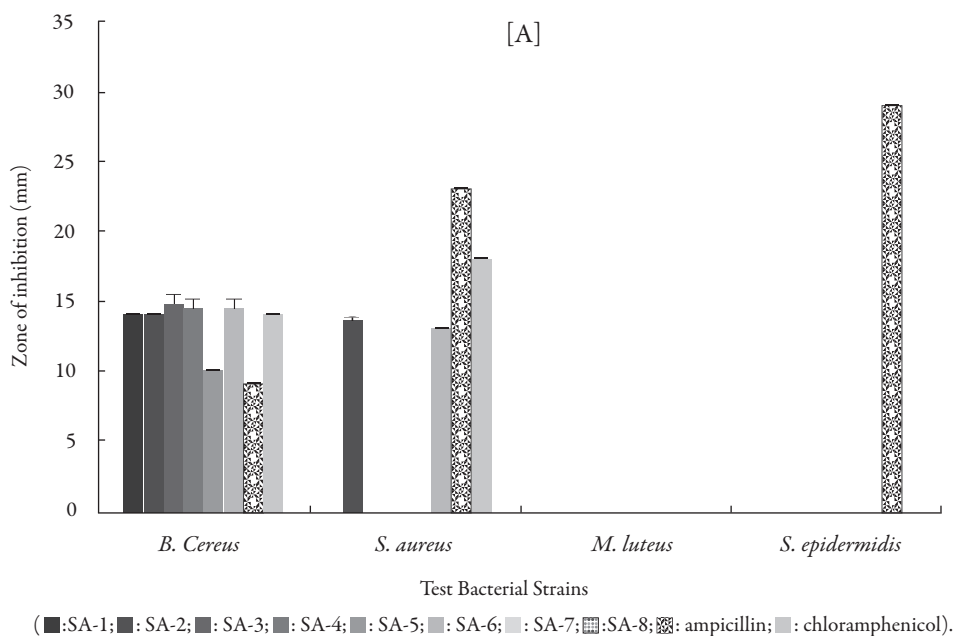
Against *K. aerogenes*, SA-1 showed maximum inhibition which contains phenyl hydrazine. This is followed by SA-8 containing 2, 5-dichloro aniline while SA-4 and SA-7 showed no inhibition at all. Thus, the presence of 4-methoxy (as in SA-4) and 4-fluoro (as in SA-7) had no effect on these selected bacterial strains

The inhibition zone of 4-amino antipyrine Schiff bases against different Gram positive and Gram negative bacteria are given in Figure 4.

It is evident from Figure 4 [A] that against *B. cereus*, all the compounds except SB-7 exhibited inhibition and maximum inhibition is for SB-3 which is followed by SB-6. SB-5 showed minimum inhibition. Against *S. aureus*, only SB-2 and SB-6 exhibited inhibition. Other compounds had no effect on this strain. For *M. luteus* and *S. epidermidis*, none of the compounds showed inhibition. Thus, these two strains are most resistant for these compounds.

Accordingly, again different compounds behave differently for different bacteria. The compounds have the same common moiety but different substituents as side chain which is given in table 2. SB-3 contains 4-fluoro phenyl whereas SB-6 is having 4-hydroxy phenyl. Thus, these two groups are more effective against *B. cereus* than other substitution groups. 2-chloro phenyl present in SB-7 is not effective at all against

Figure 4. Antibacterial activity of 4-amino antipyrin Schiff bases against [A] Gram positive [B] Gram negative bacteria.



this bacterial strain. Against *S. aureus*, only 4-chloro phenyl (as in SB-2) and 4-hydroxy phenyl (as in SB-6) are effective. However, when chloro group is at 2nd position (as in SB-7), there is no inhibition. This suggests that position plays an important role in inhibition. Thus, out of four selected Gram positive bacterial strains, *M. luteus* and *S. epidermidis* are the most resistant Gram positive bacterial strain.

Figure 4 [B] shows that only compounds, SB-3, SB-5 and SB-6 could inhibit *E. coli*. Other compounds had no effect against this bacterial strain. This suggests that 4-fluoro phenyl, 3-nitro phenyl and 4-hydroxy phenyl are effective against this strain. SB-4 also contains nitro group but at 2nd position but there is no effect of this compound on *E. coli*. Thus, the presence of group at this position is not effective. Not a single compound could inhibit *P. mirabilis* and *K. aerogenes*. Thus, *P. mirabilis* and *K. aerogenes* are the most resistant Gram positive bacterial strain.

Comparison of inhibition exhibited by Schiff bases of these two different moieties shows that most of the pyrazole Schiff bases showed inhibition. Schiff bases are not effective against *S. epidermidis*. Further, the extent of inhibition is higher for pyrazole Schiff bases. Thus, pyrazole Schiff bases are better for inhibition for these selected Gram positive and Gram negative bacterial strains.

CONCLUSION

It is concluded that the inhibition depends on the type and position of substitutions of the compounds. The effect of different substitution group is different when attached to different moiety. The pyrazole Schiff bases are better for inhibition for these selected Gram positive and Gram negative bacterial strains in comparison to 4-amino antipyrine. Overall, *B. cereus* is the most susceptible bacteria.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are very much thankful to the Head of Chemistry Department of Saurashtra University for providing necessary facilities.

DISCLOSURE STATEMENT

No potential conflict of interest was reported by the authors.

REFERENCES

1. N.R. Bader, Applications of Schiff's bases chelates in quantitative analysis: a review, *Rasayan J. Chem.*, **3**(4), 660-670 (2010).
2. S. Çakır, E. Biçer, Synthesis, spectroscopic and electrochemical characteristics of a novel Schiff-base from saccharin and tryptophan, *J. Iran. Chem. Soc.*, **7**(2), 394-404 (2010).
3. S. Kumar, D.N. Dahr, P.N. Saxena, Applications of metal complexes of Schiff bases. A review, *J. Sci. Ind. Res.*, **68**, 181-187 (2009).
4. P. Przybylski, A. Huczynski, K. Pyta, B. Brzezinski, F. Bartl, Biological properties of Schiff bases and azo derivatives of phenol, *Curr. Org. Chem.*, **13**, 124-148 (2009).
5. C. Chandramouli, M.R. Shivanand, T.B. Nayanbhai, B. Bheemachari, R.H. Udupi, Synthesis and biological screening of certain new triazole Schiff bases and their derivatives bearing substituted benzothiazole moiety, *J. Chem. Pharm. Res.*, **4**(2), 1151-1159 (2012).
6. S.S. Abd Rehim, M.A.M. Ibrahim, K.F. Khalid, The inhibition of 4-(2- amino-5-methyl phenylazo)antipyrine on corrosion of mild steel in HCl solution, *Mater. Chem. Phys.*, **70**, 268-273 (2001).
7. E. Yousif, N. Salih, J. Salimon, Improvement of photo stabilisation of PVC in the presence of 2N-salicylidine-5-(substituted)-1,3,4-triazole, *J. Appl. Polym. Sci.*, **120**, 2207-2214 (2011).
8. E. Yousif, J. Salimon, N. Salih, New stabilizer for polystyrene based on 2N-salicylidine-5-(substituted)-1,3,4-triazole compounds, *J. Saudi Chem. Soc.*, **16**, 299-306 (2012).
9. K.M. Abuamer, A.A. Maihub, M.M. El-Ajaily, A.M. Etorki, M.M. Abou-Krishna, A. Almagani, The role of aromatic Schiff bases in the dyes techniques, *Int. J. Org. Chem.*, **4**, 7-15 (2014).
10. S. Mallad, A.M. Isloor, S. Isloor, D.S. Akhila, H.K. Fun, Synthesis, characterization and antibacterial activity of some new pyrazole based Schiff bases, *Arab. J. Chem.*, **6**(3), 335-340 (2013).

11. S.A. Patil, C .T. Prabhakar, B.M. Halasangi, S.S. Toragalmathand, P.S. Badami, DNA cleavage, antibacterial, antifungal anthelmintic studies of Co (II), Ni (II) and Cu (II) complexes of coumarin Schiff bases: synthesis and spectral approach, *Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.*, **137**, 641-651 (2014).
12. Z. Guo, R. Xing, S. Liu, Z. Zhong, X. Ji, L. Wang, Antifungal properties of Schiff bases of chitosan N-substituted chitosan and quaternized chitosan, *Carbohydr. Res.*, **42**(10), 1329-1332 (2007).
13. N. Raman, S. Thalamuthu, J. Dhiveethuraja, M.A. Neelakandan, S. Banerjee, DNA cleavage and antimicrobial activity studies on transition metal (ii) complexes of 4-amino antipyrine derivative, *J. Chil. Chem. Soc.*, **53**(1), 1450-1454 (2008).
14. K.S. Kumar, S. Ganguly, R. Veerasamy, E. de Clercq, Synthesis, antiviral activity and cytotoxic evolution, *Eur. J. Med. Chem.*, **45**(11), 5474-5479 (2010).
15. M.S. Alam, J.H. Choi, D.U. Lee, Synthesis of novel Schiff base analogues of 4-amino-1,5-dimethyl-2-phenylpyrazol-3-one and their evaluation for antioxidant and anti-inflammatory activity, *Bioorg. Med. Chem.*, **20**, 4103-4108 (2012).
16. B.S. Sathe, E. Jaychandran, V.A. Jagtap, G.M. Sreenivasa, Synthesis characterization and anti-inflammatory evolution of new benzofluorothiazole Schiff's bases, *Int. J. Pharm. Res. Dev.*, **3**(3), 164-169 (2011).
17. A. Pandey, D. Dewangan, S. Verma, A. Mishra, R.D. Dubey, Synthesis of Schiff bases of 2-amino-5-aryl-1,3,4-thiadiazole and its analgesic, anti-inflammatory, antibacterial and anti-tubercular activity, *Int. J. ChemTech Res.*, **3**(1), 178-184 (2011).
18. R.P. Chinnasamy, R. Sundararajan, S. Govindaraj, Synthesis, characterization, and analgesic activity novel schiff base of isatin derivatives, *J. Adv. Pharm. Tech. Res.*, **1**(3), 342-347 (2010).
19. G.S. Kurdekar, M.P. Sathishma, S. Budagumpi, 4-Amino antipyrine-based Schiff-base transition metal complexes as potent anticonvulsant agents, *Med. Chem. Res.*, **21**, 2273-2279 (2012).
20. T. Aboul-Fadl, F.A. Mohammed, E.A. Hassan, Synthesis, antitubercular activity and pharmacokinetic studies of some schiff bases derived from 1-alkylisatin and isonicotinic acid hydrazide, *Arch. Pharm. Res.*, **26**(10), 778-784 (2003).
21. S.M.M. Ali, M.A. Azad, M. Jesmin, *In vivo* anticancer activity of vanillin semicarbazone, *Asian Pacific J. Tropical Biomed.*, **2**(6), 438-442 (2012).

22. N.M. Aburas, N.R. Stevanović, M. Milčić, A.Đ. Lolić, M.M. Natić, Ž.L. Tešić, R.M. Baošić, Influence of the structure on the antioxidant activity of tetradentate Schiff bases and their copper(II) complexes: Possible mechanisms, *J. Braz. Chem. Soc.*, **24**(8), 1322-1328 (2013).
23. Z. Guo, R. Xing, S. Liu, H. Yu, P. Wang, C. Li, P. Li, The synthesis and antioxidant activity of the Schiff bases of chitosan and carboxymethyl chitosan, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **15**(20), 4600-4603 (2005).
24. T. Singh, D. Khobragade, Synthesis of thiazolidine-4-one for their anthelmintic activity, *Unique J. Pharma. Biol. Sci.*, **2**(1), 13-15 (2014).
25. Y. Li, Z. S. Yang, H. Zhang, B.J. Cao, F.D. Wang, Artemisinin derivatives bearing Mannich base group: synthesis and antimalarial activity, *Bioorg. Med. Chem.*, **11**, 4363-4368 (2003).
26. M.S. Alam, D.U. Lee, M.L. Bari, Antibacterial and cytotoxic activities of Schiff base analogues of 4-aminoantipyrine, *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.*, **57**(5), 613-619 (2014).
27. S. Baluja, S. Chanda, N. Godvani, Synthesis and antibacterial studies of some metal chelates of 1,2,4-triazole Schiff bases, *Pharm. Chem. J.*, **48**(12), 795-799 (2015).
28. D. Menpara, K. Nandha, S. Baluja, S. Chanda, Antimicrobial activity of some quinazoline heterocycles, *World J. Pharm. Sci.*, **2**(8), 860-865 (2014).
29. J. Parekh, P. Inamdar, R. Nair, S. Baluja, S. Chanda, Synthesis and antibacterial activity of some Schiff bases derived from 4-amino benzoic acid, *J. Serb. Chem. Soc.*, **70**, 1155-1162 (2005).
30. T. Essawi, M. Srouf, Screening of some Palestinian medicinal plants for antibacterial activity, *J. Ethnopharmacol.*, **70**, 343-349 (2000).

HOW TO CITE THIS ARTICLE

S. Baluja, S. Chanda, Synthesis, characterization and antibacterial screening of some Schiff bases derived from pyrazole and 4-amino antipyrine, *Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm.*, **45**(2), 201-218 (2016).

Eletrossíntese de anestésina. Uma descrição matemática

Volodymyr V. Tkach^{1,2*}, Sílvio C. de Oliveira², Reza Ojani³, Olena I. Aksimentyeva⁴, Olga Yelenich¹,
Petró I. Yagodynets¹

¹Universidade Nacional de Chernivtsi, 58012, Rua de Kotsyubyns'ky., 2, Chernivtsi, Ucrânia

*Correio eletrônico: nightwatcher2401@gmail.com

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

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

⁴Universidade Nacional de L'viv, 79005, Rua de Kyryl e Mefodiy, 6, L'viv, Ucrânia

Recebido em: 01 de novembro de 2015

Aceito em: 02 de maio de 2016

RESUMO

Uma rota eletroquímica de eletrossíntese de anestésina (benzocáína), incluindo uma etapa anódica e uma catódica, foi avaliada, do ponto de vista mecanístico. Para tal, dois modelos matemáticos para cada passo foram desenvolvidos e analisados, mediante a teoria de estabilidade linear e a análise de bifurcações. Foram demonstradas as diferenças na pH-dependência da cinética de cada passo, bem como as diferenças nas condições de estabilidade do estado estacionário para ambas as etapas. A possibilidade do comportamento oscilatório e do monotônico também foi avaliada.

Palavras-chave: anestésina, eletrossíntese catódica, eletrossíntese anódica, oscilações eletroquímicas, estado estacionário estável

SUMMARY

Anesthesyne electrosynthesis. A mathematical description

An electrochemical route for anesthesyne (benzocaine) electrosynthesis, including one anodic and one cathodic step was mechanistically evaluated. For that purpose, two mathematical models for each step were developed and analyzed, by means of

linear stability theory and bifurcation analysis. The differences of pH-dependences of the kinetics of each step, like also in steady-state stability conditions, were investigated for both stages. The possibility for the oscillatory and monotonic behavior was also evaluated.

Keywords: anesthesyne, cathodical electrosynthesis, anodic electrosynthesis, electrochemical oscillations, stable steady-state

INTRODUÇÃO

Anestésina, ou benzocaína [1, 2], isto é, etil-*p*-aminobenzoato, é um fármaco, amplamente usado como analgético.

A anestésina é um composto derivado de compostos eletroativos (anilina e *p*-nitrotolueno). Destarte, além de várias metodologias de síntese química [3], a eletrossíntese, frequentemente usada para a obtenção, controle de produção e análise de vários fármacos e outras substâncias biologicamente ativas [4–10], também pode ser aplicada para a sua obtenção [11]. Em alguns casos, [12, 13] a eletrossíntese pode não ter analogias químicas.

Apesar de ter adquirido uma significância, o desenvolvimento da eletrossíntese de fármacos ainda enfrenta vários problemas como:

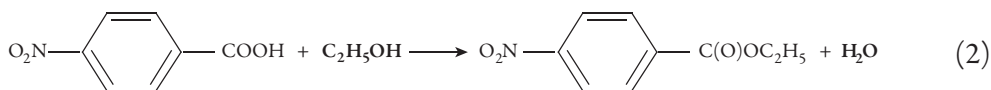
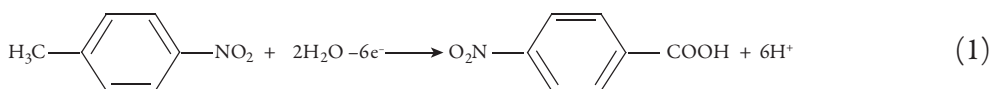
- a indecisão acerca do mecanismo mais provável da sua realização, inclusive a diferença de mecanismo;
- a possibilidade de ocorrência das instabilidades eletroquímicas (oscilatória e monotônica) durante a eletrooxidação (eletrorredução) de pequenas moléculas orgânicas ([14–22], inclusive a eletropolimerização de compostos heterocíclicos) e hidrogênio;
- a necessidade de escolha e adaptação de certas metodologias para cada meio (por exemplo, no caso da eletropolimerização anódica, os meios neutro e alcalino são mais convenientes e no caso da eletrodeposição catódica, o mais conveniente é o meio ácido).

Para a resolução dos mencionados problemas, o desenvolvimento de um modelo matemático, capaz de descrever adequadamente o comportamento do sistema, é indispensável como parte da investigação mecanística, haja vista que dá um fundamento rígido teórico, de que carecem as investigações semiempíricas experimentais. Isto lhe permite dar explicações, teoricamente fundamentadas, às instabilidades eletroquímicas, cuja ocorrência é provável [14–22]. Outrossim, a modelagem permite comparar o comportamento do sistema concreto com o dos análogos, sem ensaios experimentais e ainda prever o comportamento dos sistemas, ainda não observados experimentalmente.

Destarte, o objetivo geral do nosso trabalho será a investigação mecanística teórica da eletrossíntese de anestésico, partindo de *p*-nitrotolueno. A realização deste objetivo geral inclui a realização dos seguintes objetivos específicos: desenvolvimento e análise de modelos matemáticos, correspondentes aos passos anódico e catódico da eletrossíntese [11] do fármaco, comparação do comportamento do sistema com o dos análogos, descritos em [23–35].

SEÇÃO I. DE *p*-NITROTOLUENO AO *p*-NITROBENZOATO DE ETILA. O SISTEMA E O SEU MODELO

Conforme o trabalho [11], na primeira etapa da eletrossíntese, ocorre um processo anódico da eletrooxidação de *p*-nitrotolueno para formar o ácido *p*-nitrobenzênico, seguida pela formação do éster do ácido, conforme:



Haja vista a presença do grupo nitrila, que é aceptor de elétrons, o potencial da eletrossíntese é muito alto (+1,6 V) [11] e o processo inclui a formação de dois compostos preliminares - o álcool *p*-nitrobenzílico e *p*-nitrobenzaldeído, cuja formação foi confirmada por dados dos espectros RMN e IV [11].

Como a reação é realizada em solução alcoólica e, também, haja vista a alta velocidade de adsorção de compostos aromáticos (carbo e heterocíclicos), o processo inclui a etapa de adsorção de *p*-nitrotolueno sobre o ânodo e, destarte, no modelo matemático, introduzir-se-ão as três variáveis:

c – a concentração de *p*-nitrotolueno na camada pré-superficial;

θ – o grau de recobrimento de *p*-nitrotolueno na superfície do ânodo;

Θ – o grau de recobrimento do ácido não esterificado.

A fim de simplificar o modelo, evitando a aparição de equações diferenciais em derivadas parciais de segunda ordem, supomos que o eletrólito esteja agitando-se intensamente (destarte é possível menosprezar a influência do fluxo de convecção), que o

eletrólito de suporte esteja em excesso (o que possibilita o menosprezo das influências do fluxo de migração). Também é suposto que o perfil concentracional das substâncias seja lineal e a espessura da camada constante e igual a δ .

O *p*-nitrotolueno entra na camada pré-superficial por meio da sua difusão e, também por meio da dessorção, deixando a camada durante a adsorção. Nesta ordem de idéias, a equação de balanço da sua concentração descrever-se-á como:

$$\frac{dc}{dt} = \frac{2}{\delta} \left(\frac{D}{\delta} (c_0 - c) + r_{-1} - r_1 \right) \quad (3),$$

em que D é coeficiente de difusão, c_0 , a concentração de *p*-nitrotolueno no interior da solução, r_1 e r_{-1} são velocidades de adsorção e dessorção, correspondentemente.

O *p*-nitrotolueno entra na superfície do ânodo por meio da adsorção e desaparece, mediante a sua dessorção. Ele também é oxidado, formando o ácido *p*-nitrobenzênico. Por conseguinte, a equação de balanço da sua concentração superficial, obter-se-á sob a forma de:

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

em que G é a concentração máxima superficial do nitrocomposto e r_2 , a velocidade da sua concentração.

O ácido *p*-nitrobenzênico é formado como produto final da eletrooxidação de *p*-nitrotolueno e reage com o etanol (solvente), formando o éster. Como o ácido *p*-nitrobenzênico é mais forte que o benzênico, a esterificação, no caso daquele, ocorre de maneira mais rápida que no caso deste. Por outro lado, no trabalho [11] se utilizam os elétrodos de platina e cobre e, destarte, a salinização (com a dissolução anódica) não é possível. Posto assim, a equação de balanço da concentração superficial do ácido, ver-se-á como:

$$\frac{d\Theta}{dt} = \frac{1}{J} (r_2 - r_3) \quad (5),$$

Sendo J a concentração superficial máxima do ácido e r_3 , a velocidade de esterificação.

As velocidades dos respectivos processos podem ser calculadas como:

$$r_3 = k_3 \Theta \exp(-\alpha \Theta)$$

$$r_{-1} = k_{-1} \exp(-a\theta_1)\theta_1,$$

$$r_2 = k_2 \theta_1 \exp\left(\frac{6F}{RT} \varphi_0\right)$$

$$r_1 = k_1 \exp(a\theta)c(1-\theta-\Theta), \quad (6-9)$$

em que os parâmetros k são constantes de velocidades de respectivos processos, o parâmetro a descreve a interação entre as partículas na superfície, F é o número de Faraday, R , a constante universal de gases e T , a temperatura absoluta do vaso.

Como se vê, é um sistema clássico de eletrooxidação de um composto orgânico, cujo produto é transformado num composto solúvel, com o comportamento, parecido ao descrito em [23-35]. As características especiais deste sistema e as diferenças do seu comportamento, quando comparado com o dos análogos, discutir-se-ão abaixo:

RESULTADOS E DISCUSSÃO (SEÇÃO I)

Para investigar o comportamento do sistema com a primeira etapa da eletrossíntese da anestésina, vamos analisar o conjunto de equações diferenciais (3-5), mediante a teoria de estabilidade linear. A matriz funcional de Jacobi, cujos elementos são calculados para o estado estacionário, descrever-se-á como:

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

em que:

$$a_{11} = \frac{2}{\delta} \left(-\frac{\Delta}{\delta} - k_1 \exp(a\theta)(1-\theta-\Theta) \right) \quad (11)$$

$$a_{12} = \frac{2}{\delta} (k_{-1} \exp(-a\theta) - ak_{-1} \exp(-a\theta)\theta + k_1 \exp(a\theta)c - ak_1 \exp(a\theta)c(1-\theta-\Theta)) \quad (12)$$

$$a_{13} = \frac{2}{\delta} (-k_1 \exp(a\theta)) \quad (13)$$

$$a_{21} = \frac{1}{G} (k_1 \exp(a\theta)(1 - \theta - \Theta)) \quad (14)$$

$$a_{22} = \frac{1}{G} \left(\left(-k_{-1} \exp(-a\theta) + ak_{-1} \exp(-a\theta)\theta - k_1 \exp(a\theta)c + ak_1 \exp(a\theta)c(1 - \theta - \Theta) - \right) \right. \\ \left. - k_2 \exp\left(\frac{6F}{RT}\varphi_0\right) + pk_2\theta \exp\left(\frac{6F}{RT}\varphi_0\right) \right) \quad (15)$$

$$a_{23} = \frac{1}{G} \left(k_1 \exp(a\theta) - qk_2\theta \exp\left(\frac{6F}{RT}\varphi_0\right) \right) \quad (16)$$

$$a_{31} = 0 \quad (17)$$

$$a_{32} = \frac{1}{J} \left(k_2 \exp\left(\frac{6F}{RT}\varphi_0\right) - pk_2\theta \exp\left(\frac{6F}{RT}\varphi_0\right) \right) \quad (18)$$

$$a_{33} = \frac{1}{J} \left(qk_2\theta \exp\left(\frac{6F}{RT}\varphi_0\right) - k_3 \exp(-\alpha\Theta) + \alpha k_3 \Theta \exp(-\alpha\Theta) \right) \quad (19)$$

Pode-se ver que o *comportamento oscilatório*, neste sistema, é possível, porque se podem satisfazer as condições da bifurcação de Hopf. Estas condições requerem a presença de elementos positivos na diagonal principal do Jacobiano.

Como se pode ver, há elementos positivos $ak_{-1} \exp(-a\theta)\theta$ e $ak_1 \exp(a\theta)c(1 - \theta - \Theta)$, que descrevem o (característico para outros sistemas análogos [23–35]) comportamento oscilatório, causado pela atração de partículas do nitrocomposto. Mas, contrariamente aos trabalhos [23–35], não é o único tipo de atração entre as partículas adsorvidas que pode levar à aparição das oscilações em corrente (no modo potencios-tático). O elemento $\alpha k_3 \Theta \exp(-\alpha\Theta)$, que descreve a interação entre as partículas do ácido durante a esterificação, também é positivo e, destarte, responsável pelo comportamento oscilatório.

Também, há, neste sistema, elementos positivos, correspondentes ao comportamento oscilatório, causado pelas influências do processo eletroquímico na dupla camada elétrica (DCE). São $pk_2\theta \exp\left(\frac{6F}{RT}\varphi_0\right)$ e $qk_2\theta \exp\left(\frac{6F}{RT}\varphi_0\right)$, em que p e q são parâmetros que descrevem as influências dos processos eletroquímicos na estrutura da DCE. Tais influências também são características para os sistemas análogos [23–35].

Conclui-se, assim, que o comportamento oscilatório, neste sistema, é possível, sendo mais provável que no caso de uma eletrooxidação comum de um composto orgânico, haja vista a solubilização do éster.

Aplicando ao conjunto de equações diferenciais (3–5) o critério de Routh e Hurwitz, obter-se-á o requisito de *estabilidade do estado estacionário*. Para evitar a aparição de expressões grandes, introduzimos as novas variáveis, de modo que o determinante de Jacobiano se descreve como:

$$\frac{2}{GJ\delta} \begin{vmatrix} -K - \Xi - \Lambda & -\xi \\ \Xi & \Lambda - \Omega & \xi - \Upsilon \\ 0 & \Omega & \Upsilon - \Pi \end{vmatrix} \quad (20)$$

Abrindo os parênteses e resolvendo a inequação $\text{Det } J < 0$, obter-se-á a condição de estabilidade sob a forma:

$$(-K - \Xi)(\Lambda\Upsilon - \Lambda\Pi + \Omega\Pi - \Omega\xi) + \Xi(\Lambda\Upsilon - \xi\Omega - \Lambda\Theta) < 0 \quad (21)$$

A condição (21) satisfar-se-á com certeza, se as variáveis Λ , Υ tiverem valor negativo e Ω e Π , valor positivo, o que acontece, quando os parâmetros a , p e q têm valores negativos, ou nulos o que descreve a repulsão de partículas adsorvidas e a fraqueza das influências do processo eletroquímico na DEL, o que, diga-se a verdade, já foi observado na maioria dos sistemas análogos [23–35]. Satisfeita a condição (21), tratar-se-á de um sistema, cujo comportamento se definirá por difusão do nitrocomposto.

Quando as influências estabilizadoras são iguais às estabilizadoras, a inequação (21) transforma-se em equação e se realiza a *instabilidade monotônica*, que define a margem entre os estados estacionários estáveis e instáveis. Tal instabilidade se revela na aparição de um trecho N-formado no voltamperograma.

Em tal ponto, coexistem vários estados estacionários, cada um instável. Eles se destroem, quando as condições do comportamento do sistema se alteram.

No caso de o *ânodo* ser *ativo* na reação com ácidos, alterar-se-á o comportamento do sistema e adicionar-se-lhe-á mais um fator do comportamento oscilatório, que é a interação das partículas durante a salinização do ácido. Outrossim, como esta reação corre mais rápido que a esterificação, a estabilidade de estado estacionário perderá a sua eficiência para a eletrossíntese do fármaco, o que justifica a escolha de um ânodo inerte (platina).

Um sistema, análogo a este, pode se observar durante a eletrossíntese de polímeros condutores em seguintes condições:

- eletrossíntese de polímeros condutores ácidos em meio neutro sobre metais ativos (salinificação é responsável pela dissolução);
- eletrossíntese de polímeros condutores autodopados (que se solubilizam);
- eletrossíntese de polímeros condutores, modificados por grupos dos éteres de coroa, na presença dos compostos de metais de transição (em cuja presença se formará um complexo).

CONCLUSÕES (SEÇÃO I)

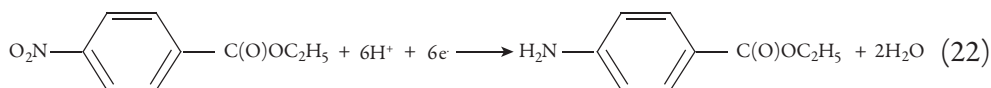
Da análise da etapa anódica da eletrossíntese do fármaco, pode-se concluir que:

- nela, trata-se de um sistema de eletrooxidação de um composto orgânico, cujo produto é, posteriormente, modificado por uma reação química;
- sendo satisfeitas as condições principais do estado estacionário (repulsão de partículas adsorvidas e fraqueza das influências da reação eletroquímica na DCE), o processo reger-se-á pela difusão do nitrocomposto;
- o comportamento oscilatório, como num sistema comum de eletrooxidação de um composto orgânico, é possível por causa da atração de partículas adsorvidas, bem como por conta das influências da reação eletroquímica na DCE. Sem embargo, a atração de partículas pode acontecer, além do processo de adsorção e dessorção, também durante a esterificação.

SEÇÃO II. DO ÉSTER AO FÁRMACO. ANÁLOGO ELETROQUÍMICO DA REAÇÃO DE ZÍNIN. O SISTEMA E O MODELO

A famosa redução de nitrobenzeno em anilina foi descoberta em 1842, pelo químico russo N.N. Zínin [36]. Posteriormente se realizou o análogo eletroquímico desta reação [37].

A segunda etapa da eletrossíntese do fármaco anestésina é catódica e se dá no cátodo de cobre (que impede a “evolução” de hidrogênio), conforme a equação:



A eletrorredução mais profunda (até o álcool *p*-aminobenzílico e etanol) se dá em potenciais catódicos mais baixos e em soluções mais ácidas.

Para fazer uma análise de estabilidade durante a transformação do éster em fármaco, introduzimos as três variáveis:

ε – a concentração do éster na camada pré-superficial;

η – o grau de recobrimento da superfície do cátodo pelo éster inicial;

H – a concentração dos prótons na camada pré-superficial, supondo o suposto acima.

Assim, o sistema com a eletrossíntese descrever-se-á com um conjunto de três equações diferenciais, apresentado como:

$$\left. \begin{aligned} \frac{d\varepsilon}{dt} &= \frac{2}{\delta} \left(\frac{\Delta}{\delta} (\varepsilon_0 - \varepsilon) + \rho_{-1} - \rho_1 \right) \\ \frac{d\eta}{dt} &= \frac{1}{\Psi} (\rho_1 - \rho_{-1} - \rho_2) \\ \frac{dH}{dt} &= \frac{2}{\delta} \left(\frac{d}{\delta} (H_0 - H) - \rho_2 \right) \end{aligned} \right\} \quad (23),$$

em que as velocidades dos respectivos processos obterão os valores de:

$$\rho_1 = k_1 \varepsilon \exp(b\eta); \rho_{-1} = k_{-1} \eta \exp(-b\eta), \rho_2 = k_2 \eta H^6 \exp(-b\eta) \exp\left(-\frac{6F\varphi_0}{RT}\right) \quad (24-26)$$

Trata-se, neste caso, de mais um sistema que tem análogos – a eletropolimerização catódica direta de um composto orgânico [38], a eletrodeposição catódica de polímero condutor, após a *in situ* geração de partículas oxidantes no cátodo [39], e processos eletroquímicos que se empregam na determinação da concentração de nitrito [40–42]. Os detalhes comuns e diferentes deste processo com os mencionados discutir-se-ão abaixo.

RESULTADOS E DISCUSSÃO (SEÇÃO II)

Analizamos o conjunto de equações diferenciais (23) mediante a teoria de estabilidade linear. A matriz funcional de Jacobi, cujos elementos são calculados para o estado estacionário, ver-se-á como:

$$\begin{pmatrix} \mathcal{G}_{11} & \mathcal{G}_{12} & \mathcal{G}_{13} \\ \mathcal{G}_{21} & \mathcal{G}_{22} & \mathcal{G}_{23} \\ \mathcal{G}_{31} & \mathcal{G}_{32} & \mathcal{G}_{33} \end{pmatrix} \quad (27),$$

em que:

$$\mathcal{G}_{11} = \frac{2}{\delta} \left(-\frac{\Delta}{\delta} - k_1 \exp(-b\eta) \right);$$

$$\mathcal{G}_{12} = \frac{2}{\delta} (k_{-1} \exp(-b\eta) - bk_{-1}\eta \exp(-b\eta) - bk_1 \varepsilon \exp(b\eta));$$

$$\mathcal{G}_{13} = 0;$$

$$\mathcal{G}_{21} = \frac{1}{\Psi} (-k_{-1} \exp(-b\eta));$$

$$\mathcal{G}_{22} = \frac{1}{\Psi} \begin{pmatrix} -k_{-1} \exp(-b\eta) + bk_{-1} \exp(-b\eta) + bk_1 \varepsilon \exp(b\eta) - k_2 H^6 \exp(-b\eta) \\ \exp\left(-\frac{6F\varphi_0}{RT}\right) + bk_2 \eta H^6 \exp(-b\eta) \exp\left(-\frac{6F\varphi_0}{RT}\right) + jk_2 \eta H^6 \exp(-b\eta) \\ \exp\left(-\frac{6F\varphi_0}{RT}\right) \end{pmatrix};$$

$$\mathcal{G}_{23} = \frac{1}{\Psi} \left(-6k_2 \eta H^5 \exp(-b\eta) \exp\left(-\frac{6F\varphi_0}{RT}\right) \right);$$

$$\mathcal{G}_{31} = 0;$$

$$\mathcal{G}_{32} = \frac{2}{\delta} \begin{pmatrix} -k_2 H^6 \exp(-b\eta) \exp\left(-\frac{6F\varphi_0}{RT}\right) + bk_2 \eta H^6 \exp(-b\eta) \exp\left(-\frac{6F\varphi_0}{RT}\right) \\ + jk_2 \eta H^6 \exp(-b\eta) \exp\left(-\frac{6F\varphi_0}{RT}\right) \end{pmatrix};$$

$$g_{23} = \frac{2}{\delta} \left(-\frac{d}{\delta} - 6k_2 \eta H^5 \exp(-b\eta) \exp\left(-\frac{6F\varphi_0}{RT}\right) \right) \quad (28 - 36)$$

Como se pode ver, neste caso o comportamento oscilatório pode acontecer e, ainda por cima, ele é mais provável neste sistema que nos processos catódicos análogos [38–42], haja vista a interação atrativa das partículas durante a solubilização do fármaco (amina) na solução ácida. É porque, além dos elementos positivos, relativos à interação das partículas adsorvidas durante a adsorção e dessorção, bem como dos relativos às influências da eletrorredução na DCE, existe mais um elemento $bk_2 \eta H^6 \exp(-b\eta) \exp\left(-\frac{6F\varphi_0}{RT}\right)$, relativo à interação de partículas adsorvidas durante a solubilização do fármaco.

A análise de estabilidade do estado estacionário, feita conforme foi descrito na seção I, pode mostrar que o processo se regerá por difusão: tanto do éster, como dos prótons. O decrescimento do pH, como nos casos dos processos [38–42], favorecerá a estabilidade do estado estacionário, contrariamente aos sistemas com a eletrooxidação anódica [23–35].

No caso da *evolução de hidrogênio*, a eletrorredução de prótons terá a sua própria influência (negativa) no processo da eletrorredução do éster. Como a difusão dos prótons é mais rápida que a do éster, ocupar-se-ão os sítios ativos de adsorção do éster, o que prejudicará a eficiência da eletrossíntese, pois então a eletrorredução irá ao segundo plano. Destarte, o uso do cátodo de cobre é justificado.

CONCLUSÕES (SEÇÃO II)

A análise de modelo da eletrorredução do éster, rendendo o fármaco anestésina mostra que:

- neste caso, o comportamento oscilatório é mais provável que nos processos catódicos análogos, haja vista a solubilização do fármaco em soluções ácidas;
- o decrescimento do pH é favorável à eletrossíntese de fármaco, pois os prótons participam da reação;
- no caso da evolução de hidrogênio, prejudicar-se-á a eletrossíntese, haja vista a ocupação dos sítios ativos da reação.

CONFLITO DE INTERESSES

Os autores declaram que não há conflito de interesses.

REFERÊNCIAS

1. <http://www.cedrosa.com.mx/info/a910.htm>, página com informações técnicas, acesso aos 20 de dezembro de 2015.
2. <http://www.drugs.com/sfx/benzocaine-topical-side-effects.html>, base de dados de fármacos; acesso aos 20 de dezembro de 2015.
3. http://academic.regis.edu/kahrendt/000%202015%20CH%20421/04%20Lab/S2015_CH421_Lab%2004_Synthesis%20of%20Benzocaine_Lab.pdf, Metodologia de síntese; acesso aos 20 de dezembro de 2015.
4. K.R. Mahantesha, B.E. Kumara Swamy, K. Vasantakumar Pai, Poly (alizarin) modified glassy carbon electrode for the electrochemical investigation of omeprazole: A voltammetric study, *Anal. Bioanal. Electrochem.*, **6**, 234 (2014).
5. Md.M. Rahman, X.-B. Li, N.S. Lopa *et al.*, Electrochemical DNA hybridization sensors based on conducting polymers, *Sensors*, **15**, 3801 (2015).
6. H. Beitollahi, H. Karimi-Maleh, I. Sheikhoae, Simultaneous voltammetric determination of ascorbic acid and uric acid using a modified multiwalled carbon nanotube paste electrode, *Casp. J. Chem.*, **1**, 17 (2012).
7. L.H. de Oliveira, A.C. Dias Souza, L. Pizzuti *et al.*, Determinação voltamétrica do antioxidante galato de propila em biodiesel empregando eletrodos de pasta de carbono modificados com líquido iônico, *Orbital. Elec. J. Chem.*, **6**, 255 (2014).
8. J.B. Raof, A. Kiani, R. Ojani, R. Valliolahi, Electrochemical determination of dopamine using banana-MWCNTs modified carbon paste electrode, *Anal. Bioanal. Electrochem.*, **3**, 59 (2011).
9. S.C.B. Oliveira, C.H.S. Mendes, F.F.S. Filho *et al.*, Electrochemical oxidation mechanism of procarbazine at glassy carbon electrode, *J. Electroanal. Chem.*, **746**, 51 (2015).
10. J.I. Gowda, S.T. Nandibewoor, Carbon paste sensor for the determination of an anticancer drug paclitaxel in pharmaceuticals and biological fluids, *Anal. Bioanal. Electrochem.*, **7**, 539 (2015).

11. Ш.Ш. Хидиров, З.М. Магомедова, М.А. Ахмедов, Кр.Н. Ашурбекова, Идентификация продуктов анодных и катодных реакций процесса электросинтеза анестезина Вестн. ДГУ. Химия., **30**, 60 (2015), publicação em russo
12. L.K. Sharma, S. Kumar, S. Singh, R.K.P. Singh, Electrochemical synthesis of 5-substituted-2-amino (substituted amino)-1,3,4-oxadiazoles at the platinum electrode, *Russian J. Electrochem.*, **46**, 37 (2010).
13. S. Singh, S. Kumar, L.K. Sharma, R.P.K. Singh, A novel electroorganic synthesis of some 2-amino -5-substituted-1,3,4-oxadiazoles at the platinum electrode, *J. Indian Chem. Soc.*, **86**, 734 (2009).
14. L. Hudson, M.R. Bassett, Oscillatory electrodisolution of metals, *Rev. Chem. Eng.*, **7**, 108 (1991).
15. M. Pagitsas, S. Dimitra, The improved Franck—FitzHugh model for the electrodisolution of iron in sulphuric acid solutions: linear stability and bifurcation analysis. Derivation of the kinetic equations for the forced Franck—FitzHugh model, *Electrochimica Acta*, **36**, 1301 (1991).
16. A.J. Pearlstein, J.A. Johnson, Global and conditional stability of the steady and periodic solutions of the Franck—FitzHugh model of electrodisolution of Fe in H_2SO_4 , *J. Electrochem. Soc.*, **136**, 1290 (1991).
17. I. Das, N.R. Agrawal, S.A. Ansari, S.K. Gupta, Pattern formation and oscillatory polymerization of thiophene, *Ind. J. Chem.*, **47**, 1798 (2008).
18. S.U. Rahman, M.S. Ba-Shammakh, Thermal effects on the process of electropolymerization of pyrrole on mild steel, *Synth. Met.*, **140**, 207 (2004).
19. A.S. Liu, M.A.S. Oliveira, Electrodeposition of polypyrrole films on aluminium from tartrate aqueous solution, *J. Braz. Chem Soc.*, **18**, 143 (2007).
20. D. Sazou, The dynamic behavior of the electrochemical polymerization of indole in acetonitrile – water mixtures, *Synth. Met.*, **130**, 45 (2002).
21. M. Bazzaoui, E.A. Bazzaoui, L. Martins, J.I. Martins, Electropolymerization of pyrrole on zinc-lead-silver alloys' electrodes in neutral and acid organic media, *Synth. Met.*, **130**, 73 (2002).
22. 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).

23. V.V. Tkach, V.V. Nechyporuk, P.I. Yagodynets', Descripción matemática de la síntesis electroquímica de polímeros conductores en la presencia de surfactantes, *Avanc. Quím.*, **8**, 9 (2013).
24. V.V. Tkach, V.V. Nechyporuk, P.I. Yagodynets', The "Polythiophene Paradox". The phenomenon and its mathematical description, *Quím. Bras.*, **7**, 59 (2013).
25. V. Tkach, V. Nechyporuk, P. Yagodynets', Eletropolimerização dos compostos heterocíclicos. Modelos matemáticos, *Cienc. Tecn. Mat.*, **24**, 54 (2012).
26. V. Tkach, V. Nechyporuk, P. Yagodynets', O estudo de estabilidade do processo da eletropolimerização de pirróis N-substituídos, *Proc. Quím.*, **8**, 49 (2014).
27. В. Ткач, В. Нечипорук, П. Ягодинец и др., Математическое описание электрополимеризации электрохимически модифицированных мономеров в гальваностатическом режиме, *Журн. Сиб. Фёд. Унив. Хим.*, **7**, 403 (2014), em russo
28. V. Tkach, V. Nechyporuk, P. Yagodynets, Estudio matemático de las condiciones de estabilidad en la polimerización electroquímica de compuestos heterocíclicos en presencia de oxidantes, *Afinidad*, **70**, 73 (2013).
29. V. Tkach, R. Ojani, V. Nechyporuk *et al.*, Cathodic and anodic potentiostatic polypyrrole electrodeposition in strongly acid media. Theoretical and experimental comparison, *Bulg. Chem. Comm.*, **48**, 126 (2016).
30. V. Tkach, V. Nechyporuk, P. Yagodynets', The mathematical description for the electropolymerization of furan, pyrrole and thiophene derivatives in alkaline media, *Med. J. Chem.*, **3**, 1122 (2015).
31. V. Tkach, V. Nechyporuk, P. Yagodynets', As eletropolimerizações galvanostática e potenciodinâmica dos compostos heterocíclicos e a sua descrição matemática, *Tecn. Met. Mat. Min.*, **10**, 249 (2013).
32. V. Tkach, V. Nechyporuk, As causas do comportamento oscilatório de sistemas eletroquímicos devido de imobilização de substâncias diferentes através da polimerização eletroquímica de combinações heterocíclicas, *Eclat. Quím.*, **37**, 68 (2012).
33. V. Tkach, S.C. de Oliveira, O.I. Aksimentyeva *et al.*, The mathematical modeling for the electropolymerization of acid derivatives of heterocyclic compounds over active metals, *Mor. J. Chem.*, **3**, 550 (2015).

34. 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).
35. V. Tkach, B. Kumara Swamy, R. Ojani *et al.*, El Mecanismo de la oxidación de omeprazol sobre el electrodo de carbono vitroso, modificado por polializarina, y su descripción matemática, *Orbital Elec. J. Chem.*, **7**, 1 (2015).
36. <http://202.127.145.151/ReferenceBook/OrganicReaction/V20.PDF> - Base de dados das reações nominais de química orgânica.
37. S.G. Mayranovskiy, "Electrosynthesis of monomers", Nauka, Moscow, 1980, 330 p.
38. V. Tkach, V. Nechyporuk, P. Yagodynets', M. Hryhoryak, A investigação do comportamento eletroquímico durante a síntese eletroreduziva de polímeros condutores na presença de cátions dos metais, *Cienc. Tecn. Mat.*, **24**, 50 (2012).
39. 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).
40. 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).
41. 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).
42. V. Tkach, R. Ojani, V. Nechyporuk, P. Yagodynets', O estudo matemático do desempenho do sensor eletroquímico de nitrito, baseado em poli(p-aminoacetanilida), *Rev. Fac. Ing. UCV*, **30**, 65 (2015).

COMO CITAR ESTE ARTIGO

V.V. Tkach, S.C. de Oliveira, R. Ojani, O. I. Aksimentyeva, O. Yelenich, P.I. Yagodynets', Eletrossíntese de anestésina. Uma descrição matemática, *Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm.*, **45**(2), 219-233 (2016).

O mecanismo do desempenho de poli-2-mercaptobenzimidazol na detecção eletroquímica de colesterol e as suas representações eletroquímica e matemática

Volodymyr V. Tkach^{1,2*}, Sílvio C. de Oliveira², Mohammad Reza M. Hosseini³, Reza Ojani⁴, Olga V. Yelenich¹, Petró I. Yagodynets¹

¹Universidade Nacional de Chernivtsi, 58012, Rua de Kotsyubyns'ky, 2, Ucrânia

*Correio eletrônico: nightwatcher2401@gmail.com

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

³Universidade Iraniana de Ciência e Tecnologia, 16846 – 13114, Teerã, República Islâmica do Irã

⁴Universidade de Mazandarã, 47416-95447, 3o km. Rodovia de Forças Aéreas Iranianas, Babolsar, República Islâmica do Irã

Recebido em: 12 de dezembro de 2015

Aceito em: 02 de maio de 2016

RESUMO

O desempenho de poli-2-mercaptobenzimidazol na detecção eletroquímica de colesterol foi avaliado fenomenológica e matematicamente. O modelo matemático correspondente foi desenvolvido e analisado por meio de teoria de estabilidade lineal e análise de bifurcações. Os dados teóricos foram comparados com os experimentais e com os teóricos para os sistemas análogos.

Palavras-chave: colesterol, polímeros condutores, sensores eletroquímicos, poli-2-mercaptobenzimidazol, estado estacionário estável

SUMMARY

The mechanism of electroanalytical function of 2-mercaptobenzimidazole in cholesterol electrochemical detection and its mathematical and chemical evaluations

The electroanalytical function of poly-2-mercaptobenzimidazole in cholesterol electrochemical detection was evaluated phenomenologically and mathematically. The corresponding mathematical model was developed and analyzed by linear stability theory and bifurcation analysis. The theoretical data were compared with the experimental data and with theoretical data for analogous systems.

Keywords: cholesterol, conducting polymers, electrochemical sensors, poly-2-mercaptobenzimidazole, stable steady-state

INTRODUÇÃO

Colesterol [1] é um álcool policíclico, derivado de ciclopentanperidrofenantreno, considerado um esteróide do grupo de esteróis. É precursor de hormônios sexuais [2] de animais vertebrados (inclusive o homem), bem como de hormônio de mudança de cor dos insetos. Toma parte ativa do metabolismo.

No entanto, haja vista a sua insolubilidade em meio aquoso, o seu excesso pode provocar o bloqueio de corrente sanguínea [3], bem como problemas renais e de fígado. Destarte, a procura de um método eficiente da sua detecção é uma tarefa atual [4–8].

A utilização de eléctrodos quimicamente modificados é um dos métodos modernos, utilizados na química eletroanalítica contemporânea [9–12]. Neste caso, um modificador usado (como polímero condutor, complexo, corante, ou outra) é escolhido haja vista a sua compatibilidade com o analito (segundo o princípio de chave e fechadura). No entanto, há dificuldades no seu uso com o colesterol, haja vista os problemas da previsão de mecanismo mais provável do desempenho de um sensor hipotético, bem como o existirem instabilidades eletroquímicas durante a eletrooxidação de compostos orgânicos (inclusive a eletrossíntese de polímeros condutores) [13–21], o que pode prejudicar a interpretação do sinal analítico.

Os dois problemas, bem como o da comparação com os sistemas análogos, empregando outros analitos e outros materiais [22–25] sem ensaios experimentais, resolvem-se pelo desenvolvimento de um modelo matemático, capaz de descrever adequadamente

o desempenho do sistema eletroanalítico, o que se fará neste trabalho para colesterol como analito e poli(2-mercaptobenzimidazol) como substância modificadora [12].

O SISTEMA E O SEU MODELO

No sensor, descrito em [12], foi descrita a eletropolimerização de 2-mercaptobenzimidazol na presença de colesterol, que se acompanhava pelo *entrapment* das suas moléculas. Não foi, de fato, um processo químico – as moléculas do hormônio ficaram presas entre as moléculas do polímero condutor sem poder sair da sua “matriz”. Este processo será controlado pela difusão de mercaptobenzimidazol e do hormônio e dar-se-á, em termos gerais, em conformidade com os modelos matemáticos, expostos em [26–28], levemente modificados (por conta do acréscimo de um adendo que descreve a saída do analito da matriz polimérica).

No caso da ausência de analito, o comportamento durante a eletropolimerização obedecerá a um dos modelos, descritos em [26–28] (dependendo das condições da síntese), sendo o 2-mercaptobenzimidazol o monômero.

Para descrever a eletrodeteção de colesterol, por meio da sua imobilização por dopagem da matriz polimérica, introduzir-se-ão as três variáveis:

c – a concentração de colesterol na camada pré-superficial;

σ – o grau de dopagem da matriz polimérica pelo colesterol;

θ – o grau de revestimento da parte do polímero, quimicamente modificada pelo analito.

É possível provar que, haja vista as suposições, feitas, por exemplo, em [26–28], o conjunto de equações diferenciais que descreve este sistema se expõe como:

$$\left. \begin{aligned} \frac{dc}{dt} &= \frac{2}{\delta} \left(\frac{\Delta}{\delta} (c_0 - c) + d_{-1} - d_1 \right) \\ \frac{d\sigma}{dt} &= \frac{1}{\Sigma} (d_1 - d_{-1} - r_1) \\ \frac{d\theta}{dt} &= \frac{1}{G} (r_1 - r_2) \end{aligned} \right\} \quad (1)$$

Em que Δ é coeficiente de difusão, δ é espessura da camada pré-superficial, d_1 e d_{-1} , a velocidade de dopagem-desdopagem da matriz pelo analito, Σ é o número máximo de

sítios de dopagem, fornecidos pela matriz do polímero condutor revestido, G é a concentração máxima do polímero condutor, r_1 e r_2 são as reações de modificações química e eletroquímica do polímero condutor.

As velocidades das respectivas reações podem calcular-se como:

$$\begin{aligned} d_1 &= k_{d1}c(1-\sigma)\exp(\alpha_1\sigma) \\ d_{-1} &= k_{d-1}\sigma\exp(-\alpha_2\sigma) \\ r_1 &= K_1\sigma(1-\theta) \\ r_2 &= K_2\theta\exp\left(\frac{nF\varphi_0}{RT}\right) \end{aligned} \tag{2-5}$$

em que os parâmetros k são constantes de respectivas reações, α_1 e α_2 descrevem as interações entre o dopante e a matriz, n é o número de elétrons transferidos, F é o número de Faraday, φ_0 é o salto do potencial na dupla camada elétrica (DCE), relacionado ao da carga zero, R é a constante universal de gases e T , a temperatura absoluta do vaso.

A principal diferença deste sistema dos relacionados [22–25] é a presença de uma etapa preliminar de dopagem-dedopagem do analito pelo polímero condutor, anterior à sua reação específica. Isto dá impacto significativo ao comportamento do sistema.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para analisar o comportamento do sistema da eletrodeteção de colesterol por meio da sua imobilização na matriz de 2-mercaptobenzimidazol, analisamos o conjunto de equações diferenciais (1), haja vista as relações algébricas (2–5) por meio da teoria de estabilidade linear. A matriz funcional de Jacobi, cujos elementos são calculados para o estado estacionário, vê-se como:

$$\begin{pmatrix} a_{11} & a_{12} & a_{13} \\ a_{21} & a_{22} & a_{23} \\ a_{31} & a_{32} & a_{33} \end{pmatrix} \tag{6},$$

em que:

$$a_{11} = \frac{2}{\delta} \left(-\frac{\Delta}{\delta} - k_{d1}(1-\sigma)\exp(\alpha_1\sigma) \right)$$

$$a_{12} = \frac{2}{\delta} (k_{d-1} \exp(-\alpha_2 \sigma) - \alpha_2 k_{d-1} \sigma \exp(-\alpha_2 \sigma) + k_{d1} \exp(\alpha_1 \sigma) - \alpha_1 k_{d1} (1 - \sigma) \exp(\alpha_1 \sigma))$$

$$a_{13} = 0$$

$$a_{21} = \frac{1}{\Sigma} (k_{d1} (1 - \sigma) \exp(\alpha_1 \sigma))$$

$$a_{22} = \frac{1}{\Sigma} \left(-k_{d-1} \exp(-\alpha_2 \sigma) + \alpha_2 k_{d-1} \sigma \exp(-\alpha_2 \sigma) - k_{d1} \exp(\alpha_1 \sigma) \right. \\ \left. + \alpha_1 k_{d1} (1 - \sigma) \exp(\alpha_1 \sigma) - \kappa_1 (1 - \theta) \right)$$

$$a_{23} = \frac{1}{\Sigma} = (\kappa_1 \sigma)$$

$$a_{31} = 0$$

$$a_{32} = \frac{1}{G} (\kappa_1 (1 - \theta))$$

$$a_{33} = \frac{1}{G} \left(-\kappa_1 \sigma - \kappa_2 \exp\left(\frac{nF\varphi_0}{RT}\right) - U\kappa_2 \theta \exp\left(\frac{nF\varphi_0}{RT}\right) \right) \quad (7-15)$$

A *instabilidade oscilatória* neste caso é possível. Outrossim, é mais provável que nos sistemas típicos do desempenho eletroanalítico de polímeros condutores e materiais afins [22–25]. O porquê disso expor-se-á abaixo.

Para a bifurcação de Hopf se realizar, a diagonal principal da matriz de Jacobi deve ter elementos positivos, responsáveis pela positiva conexão de retorno.

Vê-se que, além do adendo $-U\kappa_2 \theta \exp\left(\frac{nF\varphi_0}{RT}\right)$, cuja positividade descreve as influências na DCE, causa comum do comportamento oscilatório nestes sistemas, outro elemento capazmente positivo é $\alpha_2 k_{d-1} \sigma \exp(-\alpha_2 \sigma) + \exp(\alpha_1 \sigma) + \alpha_1 k_{d1} (1 - \sigma) \exp(\alpha_1 \sigma) > 0$, cuja positividade descreve a atração entre o analito-dopante, que é colesterol, e a matriz polimérica.

Confirma-se, destarte, a presença de estruturas dissipativas temporais, cuja existência se mantém pela difusão de colesterol (entrada de energia) e pela formação do polímero condutor na sua forma final (saída de energia).

Para analisar a *estabilidade de estado estacionário*, utilizamos o critério de Routh-Hurwitz, do qual se obtém o requisito geral $\text{Det } J < 0$. Para evitar a análise de expressões grandes, introduzimos as novas variáveis para o determinante da matriz aparecer como:

$$\frac{2}{\delta\Sigma G} \begin{vmatrix} -K-\lambda & -X & 0 \\ \lambda & X-\Xi & -\Pi \\ 0 & \Xi & \Pi-\Upsilon \end{vmatrix} \quad (16)$$

Abrindo os parênteses, obter-se-á a condição de estabilidade do estado estacionário como:

$$-\Pi\kappa X + \Upsilon\kappa X - \Gamma\kappa\Xi - \Upsilon\lambda\Xi < 0 \quad (17)$$

Obteve-se uma expressão, típica para sistemas, em que a reação é regulada pela difusão, o que acontece, quando a dopagem é mais rápida, em grandes concentrações do analito. No entanto, sendo as concentrações do analito pequenas, a difusão passa a ser mais rápida que a dopagem e a reação reger-se-á pela dopagem.

Vê-se que a negatividade do parâmetro da dopagem-dedopagem X , descrevendo a fraqueza ou ausência de atração entre a matriz e o dopante e a positividade de Υ promovem a estabilidade do estado estacionário, porque deslocam a expressão à esquerda de (17) para valores mais negativos.

No caso da igualdade das influências desestabilizadoras às estabilizadoras, obtém-se a *instabilidade monotônica*, que aparece em:

$$-\Pi\kappa X + \Upsilon\kappa X - \Gamma\kappa\Xi - \Upsilon\lambda\Xi = 0 \quad (18)$$

Reação lateral efetiva entre o analito e o polímero, paralela à dopagem, acrescentará mais um adendo às equações (1) e (3). Tal reação dá seu impacto na estabilidade do estado estacionário, diminuindo a influência de dopagem.

Autocatálise para este polímero e analito não é possível, mas se houver com outro caso análogo, aparecerá como mais uma causa do comportamento oscilatório [22–25].

CONCLUSÕES

1. A presença da etapa preliminar de dopagem do analito pela matriz do polímero condutor faz o comportamento do sistema mais complicado, haja vista a presença, nele, dos nuances da dopagem.
2. O processo eletroanalítico é regulado pela difusão, o que acontece, quando a dopagem é mais rápida, em grandes concentrações do analito. No entanto, sendo as con-

centrações do analito pequenas, a difusão passa a ser mais rápida que a dopagem e a reação reger-se-á pela dopagem.

3. A instabilidade oscilatória, além das influências na CDE, pode ser causada, neste sistema, pela atração entre o analito-dopante e a matriz polimérica que o “hospeda”.
4. Confirma-se a presença de estruturas dissipativas temporais, cuja existência se mantém pela difusão de colesterol (entrada de energia) e pela formação do polímero condutor na sua forma final (saída de energia).

CONFLITO DE INTERESSES

Os autores declaram que não há conflito de interesses.

REFERÊNCIAS

1. Informações da Sociedade Brasileira de Endocrinologia e Metabologia, URL: <http://www.endocrino.org.br/colesterol/>, acesso aos 8 de setembro de 2015.
2. K. Zhang, R. Kaufmann, Unfolding the toxicity of cholesterol, *Nat. Cell. Biol.*, **5**, 769 (2003).
3. Informe da Real Sociedade Britânica de Medicina (RMS), URL: <http://www.nhs.uk/conditions/Cholesterol/Pages/Introduction.aspx>, acesso aos 8 de setembro de 2015.
4. A. Mondal, N.R. Jana, Fluorescent detection of cholesterol using β -cyclodextrin functionalized graphene, *Chem. Comm.*, **48**, 7316 (2012).
5. T.T.N. Dinh, J.R. Blanton Jr., J.C. Brooks *et al.*, A simplified method for cholesterol determination in meat and meat products, *J. Food Comp. Anal.*, **21**, 306 (2008).
6. P. Sriwasadi, M.H. Kroll, P.H. Lolekha, Advantages and disadvantages of serum cholesterol determination by the kinetic versus the endpoint method, *Am. J. Clin. Path.*, **127**, 906 (2007).
7. L.C. Bauer, D. de A. Santana, M. dos S. Macedo *et al.*, Method validation for simultaneous determination of cholesterol and cholesterol oxides in milk by RP-HPLC-DAD, *J. Braz. Chem. Soc.*, **25**, 161 (2014).

8. C.M. Bandeira, J.M. Ferreira, G.C. Nogueira *et al.*, Application of cholesterol determination method to indirectly detect meat and bone meals in ruminant feeds, *Quím. Nova*, **36**, 1222 (2013).
9. R. Ojani, V. Rahimi, J. Raoof, A new voltammetric sensor for hydrazine based on michael addition reaction using 1-amino-2-naphthol-4-sulfonic acid, *J. Chin. Chem. Soc.*, **62**, 90 (2015).
10. S.E. Baghbmidi, H. Beitollahi, S. Tajik, Graphene oxide nano-sheets/ferrocene derivative modified carbon paste electrode as an electrochemical sensor for determination of hydrazine, *Anal. Bioanal. Electrochem.*, **6**, 634 (2014).
11. J.B. Raoof, R.Ojani, F. Jamali, S.R. Hosseini, Electrochemical detection of hydrazine using a copper oxide nanoparticle modified glassy carbon electrode, *Casp. J. Chem.*, **1**, 73 (2012).
12. M.R. Milani Hosseini, Sh. Hemmati, A. Ghaffarnejad, A. Motaharian, Fabrication of molecularly imprinted polymer coated carbon nanotubes modified gold electrode for determination of cholesterol, *Anal. Bioanal. Electrochem.*, **7**, 129 (2015).
13. L. Hudson, M.R. Bassett, Oscillatory electrodisolution of metals, *Rev. Chem. Eng.*, **7**, 108 (1991).
14. I. Das, N.R. Agrawal, S.A. Ansari, S.K. Gupta, Pattern formation and oscillatory polymerization of thiophene, *Ind. J. Chem.*, **47**, 1798 (2008).
15. S.U. Rahman, M.S. Ba-Shammakh, Thermal effects on the process of electropolymerization of pyrrole on mild steel, *Synth. Met.*, **140**, 207 (2004).
16. A.S. Liu, M.A.S. Oliveira, Electrodeposition of polypyrrole films on aluminium from tartrate aqueous solution, *J. Braz. Chem Soc.*, **18**, 143 (2007).
17. D. Sazou, The dynamic behavior of the electrochemical polymerization of indole in acetonitrile – water mixtures, *Synth. Met.*, **130**, 45 (2002).
18. 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).
19. M. Bazzaoui, E.A. Bazzaoui, L. Martins, J.I. Martins, Electropolymerization of pyrrole on zinc-lead-silver alloys' electrodes in neutral and acid organic media, *Synth. Met.*, **130**, 73 (2002).

20. 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).
21. K. Aoki, I. Mukoyama, J. Chen, Polymerization and dissolution of polythiophene films, *Russ. J. Electrochem.*, **40**, 319 (2004).
22. V. Tkach, V. Nechyporuk, P. Yagodynets, El estudio de estabilidad en el proceso del desempeño de los sensores y biosensores, basados en los polímeros conductores en medio fuertemente ácido, *Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm.*, **42**, 30 (2013).
23. 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).
24. 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).
25. V. Tkach, B. Kumara Swamy, R. Ojani *et al.*, El mecanismo de la oxidación de omeprazol sobre el electrodo de carbono vitroso, modificado por polializarina, y su descripción matemática, *Orbital Elec. J. Chem.*, **7**, 1 (2015).
26. V. Tkach, R. Ojani, V. Nechyporuk *et al.*, Cathodic and anodic potentiostatic polypyrrole electrodeposition in strongly acid media. Theoretical and experimental comparison, *Bulg. Chem. Comm.*, **48**, 126 (2016).
27. V. Tkach, V. Nechyporuk, P. Yagodynets', The mathematical description for the electropolymerization of furan, pyrrole and thiophene derivatives in alkaline media, *Med. J. Chem.*, **3**, 1122 (2015).
28. V. Tkach, S.C. de Oliveira, O.I. Aksimentyeva *et al.*, The mathematical modeling for the electropolymerization of acid derivatives of heterocyclic compounds over active metals, *Mor. J. Chem.*, **3**, 550 (2015).

COMO CITAR ESTE ARTIGO

V.V. Tkach, S.C. de Oliveira, M.R. Hosseini, R. Ojani, O. Yelenich, P.I. Yagodynets', O mecanismo do desempenho de poli-2-mercaptobenzimidazol na detecção eletroquímica de colesterol e as suas representações eletroquímica e matemática, *Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm.*, **45**(2), 234-242 (2016).

Drug information centers: An overview to the concept

Mónica Alexandra Nova Manosalva^{1*}, José Julián López Gutiérrez^{1**}, Martín Cañas²

¹Universidad Nacional de Colombia, Departamento de Farmacia. Carrera 30 N.º 45-03. Grupo RAM: Red para el uso Adecuado de Medicamentos.

*E-mail: manovam@unal.edu.co

**E-mail: jjlopezg@unal.edu.co

²Federación Médica de la Provincia de Buenos Aires, La Plata, Argentina.

Received: July 26, 2015

Accepted: June 22, 2016

SUMMARY

Drug Information Centers (DIC) have an important place in the health care process since they provide independent and updated information. A search was developed in Medline, Science Direct, Academic Search Complete, LILACS and Academic Google in order to know the state of the art of DIC around the world. Regarding to a timeline, the first European DIC was created in 1960 and studies that described local situation were identified in 1996 and 2001. Thereafter, in the United States the first DIC was created in 1962 and 3 studies that describe DIC characteristics and changes through time were identified between 2003 and 2008. Moreover, DICs were created in Singapore in 1980 and in Venezuela in 1981. In India was created a DIC in 1997. Subsequently, the WHO performed workshops in 2006 in order to create new centers in this country. In Asia was conducted a study in 1996 that identified 4 DIC. Concerning Latin America were found studies that describe local DIC from Brazil (2001) and Costa Rica (2003). Also, the network of Latin American and Caribbean DICs (REDCIMLAC) was created in 2011. In all consulted studies the DICs features were described including type of questions, professionals and infrastructure among others. Some of these studies included a comparison with the WHO technical document.

Keywords: Drug Information Center, rational drug utilization.

RESUMEN

Centros de información de medicamentos. Una visión global del concepto

Los Centros de Información de Medicamentos (CIM) ocupan un lugar importante en el proceso de atención en salud al proporcionar información independiente y actualizada. Con el fin de conocer el estado del arte de los CIMs alrededor del mundo, se desarrolló una búsqueda en las bases de datos Medline, Science Direct, Academic Search Complete, LILACS y en Google Académico. Revisando cronológicamente la creación de CIMs, se encontró que el primero fue fundado en Europa en 1960. Posteriormente, se crearon en Estados Unidos en 1962, Singapur, 1980 y Venezuela, 1981. En India se fundó un CIM en 1997, posteriormente la OMS dictó talleres en ese país para fortalecer la creación de nuevos CIMs en 2006. En Asia se realizó un estudio en 1996 que identificó cuatro CIMs. En cuanto a Latinoamérica, se encontraron estudios de Brasil (2001) y Costa Rica (2003) que describen los CIMs locales. Adicionalmente, en 2011, se creó la red de CIMs de Latinoamérica y el Caribe (REDCIMLAC). En todos los estudios consultados se identificaron características de funcionamiento de los CIMs, como infraestructura, tipo de consultas, personal, entre otras. Algunos de estos estudios incluyeron una comparación con el documento técnico de la OMS.

Palabras clave: Centro de Información de Medicamentos, uso racional de medicamentos

INTRODUCTION

More than 50 years after the development of the concept of Drug Information Center, they occupy an irreplaceable position in the health care process, to be the ideal sources of scientific information for the user through the available database, to receive appropriate information to solve their problem or special need [1].

The Pan American Health Organization (PAHO) defines Drug Information Centers (DIC) as operational units that provide technical and scientific information about drugs in an objective and timely manner. Also states that they constitute an optimal strategy to meet particular needs of information. To do this, the DIC have databases and sources of drug information and trained professionals that generate independent information relevant to the requests that are made or any need identified [2]. Other

authors define a DIC as “an institution dedicated to provide objective, independent and current information on drugs and their use, and communicate to the different categories of users for better understanding and benefit of patients” [1]. On the other hand, PAHO defines Drug Information Services (DIS) as part of the activities of pharmaceutical services of a health institution with essential presence of the pharmaceutical professional who provides drug information services supported by scientific sources, updated and independent [1]. Therefore, DIS belongs to an institution and provides information services only within it. The overall objective of the DIC is to promote rational drug use through technical-scientific, objective, current, timely and relevant duly processed and evaluated information [2].

It is generally accepted that the DIC have two basic functions: the development of passive information addressed to solve or contribute to the solution of problems related to drug use in individual cases, and the development of Active Information, represented by education activities, dissemination of information and research in the field of drugs [1]. Within a DIC can specify the following functions: attention to drug information questions, information dissemination, research and education [1-2].

PAHO has raised some basic requirements to run a DIC, which contemplates a physical area used exclusively for the DIC and with sufficient capacity for normal operation (with an area for the reception of requests for information, for the library and work area or to read and assess the information); general office equipment (computer with printer and Internet access, microfiche reader, copier and external hotline and fax services); information resources including primary sources (journals); secondary (indexes, abstracts, databases) and tertiary (books, abstracts, forms), human resource consists of a center director (preferably a pharmacist or a doctor) with expertise in information, clinical pharmacology and therapeutics.

Attendees can be internal, students or interns and secretary, and funding sources that could be agreements between public and private institutions as long as it is never forgotten the preservation of the independence of the information supplied by the center or the collection of services provided by the DIC preferably with differential scales [1-2].

The first Drug Information Centre in Europe was created in 1960 in the UK. Since then they have been developing formal DICs worldwide in order to provide accurate and timely information in response to specific questions on drugs [3].

The above guidelines PAHO Drug Information Centers, which were raised in 1995 and 1997 [1-2] define the fundamental aspects of a DIC operation. However, some of these requirements may be obsolete or need an update.

METHODOLOGY

In order to identify whether the concept of DIC varied in different countries or whether there were differences in their functioning, a narrative review by mean search in Medline, Science Direct and Academic Search Complete, available on the platform SINAB (Universidad Nacional de Colombia Library) was performed, as well as in the LILACS database. Descriptors were used as search terms “drug information center”, “drug information service” and “rational use of medicines drugs utilization”. In the case of databases searched through SINAB platform, only articles with full text available were included.

Additionally a search in Google Academic and the Virtual Health Library, NLM were performed in order to complement the information on the state of the art of DIC in Latin America.

RESULTS AND DISCUSSION

The search strategy found 445 articles. After removing duplicate papers and those papers that do not contain the term “Drug Information Center” in the title, it was proceeded to review the abstracts to identify those papers related to definition and functioning of DIC. Finally, 11 papers were available for review. Figure 1 shows the flow diagram.

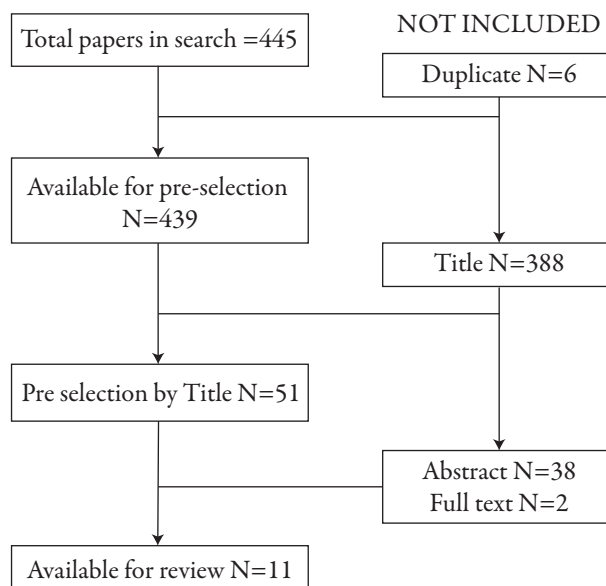


Figure 1. Flow diagram of articles included in the review.

This search allowed finding previous overviews about DIC. However, the scope of the found papers was national or about a specific region. This review sought to provide a description worldwide of DIC.

The first European DIC was created in United Kingdom in 1960. Since then, it had been developing formal DIC around the world [3].

In 1996 Müllerová and Vlcek implemented a survey of activities of 129 drug information centers in 18 European countries. The response rate was 71.3% (n=92) and the information from 84 DICs that met the inclusion criteria was analyzed. The results of the study show that DICs are affiliated mainly with European hospitals (68%), and rarely to pharmacy (6%) or medical schools (8.3%).

The activities of the DICs included service response questions (98%), publishing newsletters (68%), participation in committees of Pharmacy and Therapeutics (F & T) (63%), tutorials (61%) and use evaluation drug (52%). The most frequently employees of DICs are the pharmacists, usually 1 or 2 full time or part time. By analyzing the query resolution service it was found that 56% of the DICs offer their services only to health professionals and 43% to both these professionals and the general public. The questions were mainly related to adverse effects, indication / therapeutic use and dosage of drugs. Most DICs (91%) frequently recorded their activities in a computer database. Quality assurance activities were developed in 75% of centers, usually by means of reviews (58%) or feedback questionnaires (32%). The most frequently used information sources were Martindale-The Exterpharmacopeia, journals such as Lancet and databases such as Medline and Micromedex. The DICs are generally funded by the organizations they are affiliated with. The 9.5% of DICs charged fees for special activities [4].

In 2001 Scala *et al.* published a study of Italian Information Centers. The results resembled European and American trends [3]. It was found that the number of DICs in Italy grew rapidly since 1985, but then stalled in the 90s. According to the authors, this behavior is due to the availability of computerized drug information designed to be user friendly, many of them online, which could facilitate to satisfy the users information needs without consulting a formal DIC. Comparing the results with those found in a survey conducted in Italy in 1997, a greater number of DICs acquired direct Internet access (60%), allowing pharmacists to use online resources. Another finding was an increase in the number of DICs produced newspapers and newsletters (48% in 1997 vs. 90% in 1999), reflecting the increased interest in active information [3].

In the United States the first Drug Information Center was created in 1962 at the University of Kentucky and since then some studies have been published which review various

aspects of U.S. DICs. Rosenberg *et al.* have studied the national scene DICs using surveys since 1974, in 2003 it was conducted a study that aimed to make a diagnosis of the current state of the centers and compare the results with those of similar surveys applied in the past 30 years. 151 DICs were contacted, and 119 of them responded to the survey (79%); 81 met the inclusion criteria.

The U.S. centers were located in 33 states, the District of Columbia and Puerto Rico. The results showed that most DICs are affiliated with hospitals or medical centers (72%) and pharmacy schools (61%). The staff was composed mainly of pharmacists, students, interns, residents, secretaries and administrative staff. Only 12% of the DICs reported not having at least one full-time pharmacist, 71% of pharmacists were doctors of pharmacy (PharmD) and 24% had bachelor's degree, plus 9% had a master's degree in science, master's degree in business administration, master of public health, or doctoral (Ph.D.), 94% of reported DICs had within its staff at least 1 pharmacist PharmD title.

The services offered by DICs, from the U.S, in addition to answering questions about medications, included the preparation of newsletters (80%), participation in activities of the pharmacy and therapeutics committees (79%), training or education (79%), development of administrative tasks not directly related to the DIC (66%), literature search queries not related to daily living (65%), reporting of adverse reactions (65%), and development of medicines use reviews (63%). The main consultants were pharmacists (40.6%), doctors (24.4%) and nurses (15%). The questions were related more often with therapeutic issues (17%), adverse reactions (16.2%), identification of U.S. or foreign products (14.3%) and dosage (10.1%). For the system used to access, store and retrieve the questions and answers, 38% of the DICs used a computerized database, 32% use a paper system and 30% used both. A formal program of quality assurance had been implemented in 51% of the DICs and in 18% it was being developed, the consultation service drug information is most commonly evaluated using criteria such as accuracy, that the answer is complete, documentation references used, timeliness, clarity, objectivity and impact on patient care.

In the U.S. centers, the most common method for judging was an internal review by a person (70%), followed by feedback from the applicant (36%), and internal review by a committee (21%). The most commonly reported source acknowledged as useful was Micromedex Healthcare Series, followed by Medline and AHFS Drug Information. The DICs funding came primarily from U.S. hospitals and medical centers (73%) and schools and universities (37%), other sources including charging fees for certain activities (19%), federal and state aid (5%), pharmaceutical companies (4%) and non-governmental organizations and foundations (1%). When comparing these

results of 2003 with those of similar surveys applied in the past 30 years, it was found that the number of DICs decreased in the last decade and the number of pharmacists and other staff was the lowest in the last 30 years. Pharmacists were better trained than in the past and a large percentage had high educational qualifications. The services remained consistent with previous findings, except for the increased participation in training and education of pharmacy students and residents. The percentage of DICs system with formal quality assurance did not change significantly in the past decade and funding resources and service fees remained the same [5].

In 2008, Rosenberg *et al.* conducted a study that surveyed 89 U.S. DICs previously identified in 2003 to determine if they still existed and if they had experienced changes. We found that 75 (84%) of the 89 DICs remained active. The most notable change in the activities was the increase in the time spent on education to students in the area of health (53%), in supporting the pharmacovigilance program of the institution (44%), and to provide system support information (36%). No changes in the number of employees were observed. With respect to the number of questions received, 29% of the DICs reported an increase, 42% a decrease and 29% no change, 70% reported having had an increase in the number of complex questions, while 53% reported an increase the time required to answer each question [6].

In the United States, FDA sponsored two DICs, one located in the (Center for Biologics Evaluation and Research [CBER]) and another in the Center for Drug Evaluation and Research (CDER). Each DIC provided product information and regulatory guidance. Representing the regulatory agency, these DICs provided services to a wider range of applicants than those DICs belonging to hospitals, universities and the pharmaceutical industry. In essence, served as a liaison between the public and FDA [7].

The CBER had divided his work into two branches DIC: the first was in charge of consumer-related issues and the second to assist manufacturers and technical training, the first was the one who answered questions on issues related to eligibility criteria for blood and tissues donor, approval of products, and tips for finding clinical trials in a specific search. The human resource CBER DIC is comprised of individuals who had received a course of at least 30 hours of education in science, public affairs specialists and education. Each branch had about 6 people with a wide range of professions, such as nursing, social work, animal science, journalism and molecular genetics. About 600 questions were answered per month and the response time of most queries was approximately 1 to 3 days. On the CDER, Division of Drug Information (DDI) was responsible for answering questions from the public about products for human use. The topics of the queries were related to clinical aspects of particular molecule or a group of drugs and drug regulation either new, as generic or OTC. In the DDI 12 pharmacists and

one nurse worked and they received about 1,000 phone calls and 900 emails per week. The answers were usually given by phone the next day and the mails were responded within two days [7]. The main difference of these DICs of the FDA with those DICs of hospitals and universities was that the former does not provide medical advice to abstain from prescribing information approved by the FDA; therefore, these DICs did not necessarily perform an extensive literature search that took into account other uses other than those approved by the FDA. The DDI had great confidence in the information posted on the FDA Web site but also used traditional information resources of a DIC. An additional reference used was the internal databases that allow to review previously resolved questions. The two DICs answered questions that might require the use of multiple sources in their respective divisions, including offices of product review, quality, medical policies, etc. [7].

Reviewing the situation in other parts of the world, a study was found in 2006 in Bangalore, India, where the World Health Organization (WHO) conducted a training workshop which included an introduction to information activities of drugs and rational use thereof. The course was part of a program to spread the influence of drug information centers and training programs in clinical pharmacy that had been developed in southern India during the previous 10 years. This program was coordinated by the Board of Pharmacy of the state of Karnataka (KSPC) and sponsored by the WHO office in India [8]. The KSPC founded a DIC in 1997 but the project included the creation of five independent DICs across the country [9]. The projected centers might provide information to health personnel and the general public, and also meet the reporting of suspected adverse reactions [8]. These centers would act as state DICs able to respond to the level of detail requested [9]. The WHO planned to grant limited financial resources to purchase information resources but in the long term would require financial support from the state [8]. As part of the financing it would receive an initial amount to purchase reference books and extra money monthly for 6 months for recurrent expenditure [9].

Very little was known about the DICs of eastern Asia. In 1996 a drug information pharmacist handed a formal setting and it was a relatively new concept in this part of the world. It was not until 1980 that the first organized DIC was created in Singapore. Then in 1996, Lim and Chui conducted a study conducted by pharmaceutical DICs there. At the time of the study there were 3 DICs located in hospitals and 1 in the Pharmaceutical Department of the Ministry of Health. Hospitals were in charge for the funding for the first 3, while the latter were funded by the government and no fees were charged in cases for services or external applicants. All centers were well equipped with cabinets, telephone, fax, photocopier, computers, and Internet access (with the exception of one DIC). The most used bibliographic resource was Micromedex, followed

by Martindale, AHFS Drug and compendia as Index of Malaysia & Singapore and British National Formulary. Less than 4% of the consultations needed secondary sources of literature, but Medline was the resource of choice in such cases. All DICs had access to a medical library.

Of the four DICs of Singapore surveyed, three had one on staff full-time pharmacist. None had any formal training in drug information as graduate training; one of them had a master's degree in Clinical Pharmacy, while another was studying for the same title. There were no quality assurance programs except for a center that was sending feedback forms to users once a year, but all DICs had developed operational policies and procedures manuals.

The four centers of Singapore recorded manually each question received; these records contained the date, the applicant's name, a contact number, the question asked, the answer given, the response time, references used and the signature of the pharmacist who gave the information. The average monthly consultation was between 92 and 259. Most queries were answered in five minutes, only less than 10% required more than 1 hour to be resolved. In approximately 80% of the consultations was used only one reference. The most frequent consultants were physicians (51%), pharmacists (32%) and nurses (10%).

In hospital's DICs, the most common questions were dosing, availability of a drug and identification; others were choosing a therapy, administration, adverse effects and drug safety. In the DIC located in the Ministry of Health request printed literature consultation drug was the most common, followed by questions about adverse reactions, product availability, formulation and identification [10].

LATIN AMERICAN SITUATION

In 2003, Costa Rica performed a study diagnosis of DICs belonging to national public institutions, in order to determine the degree of fit to the requirements of the PAHO. The results showed that there were 7 public units drug information: 4 DICs and 3 Drug Information Services (DIS), of which 6 were located in a hospital and one at a university. The primary sources of information suggested by PAHO were not available in 5 of the centers. Of the 36 recommended tertiary sources, 15 were not available at any of the centers. The most frequent activities were resolving queries of the community hospital or outpatient users, implementation of education programs for patients and risk groups and programs for student training rotation. The authors conclude that the activities of different DIC in Costa Rica were similar to each other, not just respond to the guidelines of the PAHO, but have similarities with the activities

and operations of other DIC worldwide, also showed that the bibliographical support must be strengthened [11].

Moreover, Brazil had established a nationwide network of DIC, which was organized on a decentralized, non-hierarchical manner and operates on cooperation protocols. The network was called The Brazilian Drug Information System (SISMED) and was the result of inter-agency effort to support multidisciplinary health team, optimizing the resources available in this area and promoting rational drug use. Also it could support the development of the pharmaco-epidemiological studies in the country, with emphasis on pharmacovigilance as one of the activities the DIC could do. Among the strategies to implement SISMED were specialized professionals and frequent meetings of the coordinators of the DICs to share experiences. Training courses had been given, and national meetings of professional from the DICs had been made, activities that have helped the development of the national network and the strengthening Brazilian DIC of drug information system in Brazil [12].

In 1992 the Federal Council of Pharmacy of Brazil (CFF), together with the Pan American Health Organization, created the Brazilian Center for Drug Information (CEBRIM-Centro Brasileiro de Informação sobre Medicamentos). Silva et al. conducted a cross-sectional descriptive study between November 2000 and October 2001 in order to analyze the results of CEBRIM and the opinion of its users [13].

The results were that CEBRIM answered 970 questions in the study period, with a monthly average of 81 questions, showing that this DIC answered more questions than many others Brazilian DICs at a rate of 30%. The percentage of patients who consulted the center was very low (34.5%). In 44% of cases the answer was delivered in 24 hours. Of the users surveyed, 89.5% reported receiving response time, 88% thought it was clear, objective and 85% that the information was complete. The 99.2% of patients declared its intention to use the DIC service. The authors conclude that the CEBRIM served its purpose of providing drug information in an objective, timely and updated manner. It could be considered that the center plays an important role in promoting rational drug use and is a useful tool for health professionals in the care of patients [13].

Since 2011 the Latin America and the Caribbean DIC Network (REDCIMLAC for its acronym in Spanish) has been formed, as an initiative of the Drug Utilization Research Group-LA and with support from PAHO/WHO to link the DIC in Latin America and the Caribbean, respecting their autonomy (web page: <http://web2.redcimlac.org/>) [14]. This network consists of 19 countries and 29 information centers. These centers were created and in some cases supported by PAHO / WHO so they all retain the basic guidelines of this organization white paper [14].

In figure 2 the creation of the DICs included in this review is summarized by year.

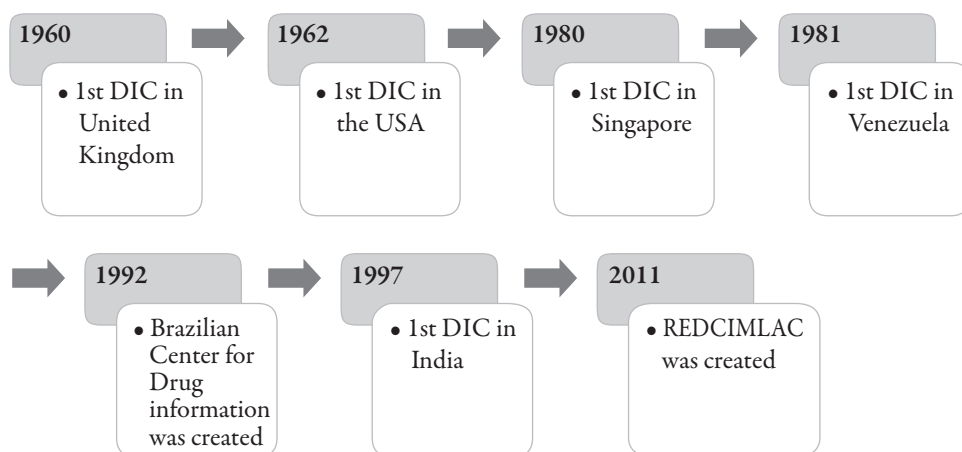


Figure 2. DIC creation timeline.

Although it was not possible to compare the same variables for all DIC it could be observed that they did not limit solely to answer consultations but they also participate in different activities, in some cases in education-related activities, in other cases in the productions of bulletins, participation in pharmacy and therapeutics committees, and other activities. It was also observed that most belong to hospitals or pharmacy schools.

With respect to financing, it was found that the economic resources come from independent sources like hospitals, government, universities, and the charging of fees for consultation; only one DIC study in the US reported that 4% of DIC receives economic resources from the pharmaceutical industry.

It is concluded that the concept and functions of the DIC are constant over time and across countries. As expected, an increase in the number of countries with an established CIM is evident worldwide.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank the Universidad Nacional de Colombia and the Network of Latin America and Caribbean Drug Information Centers (REDCIMLAC).

DISCLOSURE STATEMENT

No potential conflict of interest was reported by the authors.

REFERENCES

1. R. D'Alessio, U. Busto, N. Girón, "Guía para el desarrollo de servicios farmacéuticos hospitalarios: información de medicamentos", Serie Medicamentos Esenciales y Tecnología N.º 54. Organización Panamericana de la Salud, 1997.
2. Grupo de trabajo regional sobre centros de información de medicamentos de la Organización Panamericana de la Salud, "Centros de Información de Medicamentos: una estrategia de apoyo al uso racional de medicamentos", PAHO HQ Library, Santo Domingo, 1995.
3. D. Scala, A. Bracco, S. Cozzolino, A. Cristinziano, C. De Marino, A. Di Martino, E. Gonzalez, A. Mancini, F. Romagnuolo, L. Zeuli, Italian drug information centres: benchmark report, *Pharm. World Sci.*, **23**, 217 (2001).
4. H. Müllerová, J. Vlcek, European drug information centres-survey of activities, *Pharm. World Sci.*, **20**, 131 (1998).
5. J.M. Rosenberg, T. Koumis, J.P. Nathan, L.A. Cicero, H. McGuire, Current status of pharmacist-operated drug information centers in the United States, *Am. J. Health-Syst. Pharm.*, **61**, 2023 (2004).
6. J.M. Rosenberg, S. Schilit, J.P. Nathan, T. Zerilli, H. McGuire, Update on the status of 89 drug information centers in the United States, *Am. J. Health-Syst. Pharm.*, **66**, 1718 (2009).
7. K.C. Dada, M.E. Kremzner, S.K. Bhanot, R. Lal, Role of FDA's drug information centers, *Am. J. Health-Syst. Pharm.*, **65**, 803 (2008).
8. International Pharmaceutical Federation (FIP), Developing drug information centres in India, *WHO Drug Information*, **21**, 130 (2007).

9. BioBoard, KSPC to Set up Drug Information Centers with WHO Funding, *Asia Pacific Biotech News*, **11**, 1 (2007).
10. L.Y. Lim, W.K. Chui, Pharmacist-operated drug information centres in Singapore, *J. Clin. Pharm. Ther.*, **24**, 33 (1999).
11. V. Hall, C. Gómez, F. Fernandez-Llimos, Situation of drug information centers and services in Costa Rica, *Pharm. Pract. (Granada)*, **4**, 83 (2006).
12. C. Vidotti, R. Hoefler, E.V. Silva, G. Bergsten-Mendes, Sistema Brasileiro de Informação sobre Medicamentos (SISMED), *Cad. Saude Publica*, **16**, 1121 (2000).
13. E. Silva, L. Castro, L. Bevilaqua, C. Vidotti, R. Hoefler, CEBRIM: the Brazilian Drug Information Center: characterization of services provided and user's opinions, *Rev. O.F.I.L.*, **13**, 55 (2003).
14. Red de Centros de Información de Medicamentos de Latinoamérica y el Caribe. URL: <http://web2.redcimlac.org/>, consultado en abril de 2013.

HOW TO CITE THIS ARTICLE

M.A. Nova-Manosalva, J.J. López-Gutiérrez, M. Cañas, Drug information centers: An overview to the concept, *Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm.*, **45**(2), 243-255 (2016).

Solution thermodynamics and preferential solvation of 3-chloro-N-phenyl-phthalimide in acetone + methanol mixtures

Grecia Angeline del Mar Areiza Aldana¹, Aleida Cuellar Lozano¹, Nasly Alexandra Peña Carmona¹, Diego Iván Caviedes Rubio¹, Abbas Mehrdad², Amir Hossein Miri², Gerson Andrés Rodríguez Rodríguez³, Daniel Ricardo Delgado^{1*}

¹Programa de Ingeniería Industrial, Universidad Cooperativa de Colombia, Neiva, Colombia.

* E-mail: danielr.delgado@campusucc.edu.co

²Department of Physical Chemistry, Faculty of Chemistry, University of Tabriz, Tabriz, Iran.

³Grupo de Investigaciones Farmacéutico-fisicoquímicas, Departamento de Farmacia, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, Sede Bogotá, Cra 30 N. ° 45-03, Bogotá D.C., Colombia.

Received: June 8, 2016

Accepted: June 23, 2016

SUMMARY

The thermodynamic properties of the 3-chloro-N-phenyl-phthalimide in acetone + methanol cosolvent mixtures were obtained from solubility data report in literature. The solubility was higher in near acetone and lower in pure methanol at all temperatures studied. A non-linear plot of $\Delta_{\text{soln}}H^\circ$ vs. $\Delta_{\text{soln}}G^\circ$ shows a negative slope from pure acetone up to $x_1 = 0.691$. Beyond this composition, a variable positive slope is obtained with the exception of mixtures with $x_1 = 0.121$, $x_1 = 0.272$ and $x_1 = 0.356$ which is a not common trend in these systems. The preferential solvation of 3-chloro-N-phenyl-phthalimide by the components of the solvents was estimated by means of the inverse Kirkwood–Buff integral method, showing the 3-chloro-N-phenyl-phthalimide is preferential solvated by methanol in more polar mixtures and by acetone in less polar ones.

Keywords: 3-Chloro-N-phenylphthalimide, solubility, solution thermodynamics, activity coefficients, preferential solvation.

RESUMEN

Termodinámica de soluciones y solvatación preferencial de 3-cloro-N-fenil-ftalimida en mezclas acetona + metanol

Las propiedades termodinámicas de 3-cloro-N-fenil-ftalimida en mezclas cosolventes acetona + metanol fueron obtenidas a partir de los datos de solubilidad reportados en la literatura. La mayor solubilidad se presentó en acetona y la menor en metanol puro en todas las temperaturas estudiadas. La grafica $\Delta_{\text{soln}}H^\circ$ vs. $\Delta_{\text{soln}}G^\circ$ presenta una tendencia no lineal, con una pendiente negativa desde la acetona pura hasta $x_1 = 0,691$ a partir de esta composición hasta el metanol puro se obtiene una pendiente positiva variable con la excepción de las mezclas con $x_1 = 0,121$, $x_1 = 0,272$ y $x_1 = 0,356$, la cual es una tendencia poco común en estos sistemas. La solvatación preferencial de 3-cloro-N-fenil-ftalimida por cada uno de los solventes de la mezcla se estimó por medio del método de las integrales inversas de Kirkwood-Buff mostrando que la 3-cloro-N-fenil-ftalimida se solvata preferencialmente por metanol en las mezclas más polares y por acetona en las menos polares.

Palabras clave: 3-cloro-N-fenil-ftalimida, solubilidad, termodinámica de soluciones, coeficiente de actividad, solvatación preferencial.

INTRODUCTION

3-chloro-N-phenyl-phthalimide (Fig. 1) (Synonyms: 4-chloro-2-phenyl-isoindoline-1,3-dione; 4-Chloro-2 phenyl-isoindolin-1,3-dion; 3-Chloro-N-phenyl-phthalimid; 4-chloro-2-phenyl-isoindole-1,3-dione; 3-chloro-N-phenyl-phthalimide) is an interesting compound because of its use in the synthesis of 3,3'-bis(N-phenylphthalimide) and 2,2',3,3'-diphenylthioether dianhydride, which are monomers for the preparation of polyimide, and those synthetic routes require a high purity 3-chloro-N-phenyl-phthalimide [1].

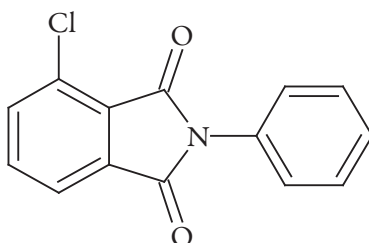


Figure 1. Molecular structure of 3-chloro-N-phenyl-phthalimide.

Knowledge of thermodynamic properties and preferential solvation is important in order to optimize synthesis processes like aforementioned [2]. For this reason, the purpose of this study is to evaluate the effect of the co-solvent composition on solubility, solution thermodynamics and preferential solvation of 3-chloro-N-phenyl-phthalimide in binary mixtures of acetone and methanol. The temperature dependence of the solubility allows a thermodynamic analysis that permits insight into the molecular mechanisms involved in the solution processes. The other hand, the estimate of the preferential solvation of the solute by the components of the solvent mixture, it is performed by the application of the inverse Kirkwood-Buff integral (IKBI) method [3-5].

THEORETICAL

Ideal solubility

The ideal solubility as a function of temperature can be calculated by using the following equation:

$$\ln x_3^{\text{id}} = -\frac{\Delta_{\text{fus}}H(T_{\text{fus}} - T)}{RT_{\text{fus}}T} + \left(\frac{\Delta C_p}{R}\right) \left[\frac{(T_{\text{fus}} - T)}{T} + \ln\left(\frac{T}{T_{\text{fus}}}\right) \right] \quad (1),$$

here x_3^{id} is the ideal solubility of the solute as mole fraction, $\Delta_{\text{fus}}H$ is the molar enthalpy of fusion of the pure solute (at the melting point), T_{fus} is the absolute melting point, T is the absolute solution temperature, R is the gas constant ($8.314 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$), and ΔC_p is the difference between the molar heat capacity of the crystalline form and the molar heat capacity of the hypothetical super-cooled liquid form, both at the solution temperature [6]. Since ΔC_p cannot be easily experimentally determined it is usual assuming that it may be approximated to the entropy of fusion, $\Delta_{\text{fus}}S$ [7].

Activity coefficients

The activity coefficients γ_3 , were calculated as x_3^{id}/x_3 where x_3 is the experimental solubility. From γ_3 values a rough estimate of solute-solvent intermolecular interactions can be made by considering the following expression [8]:

$$\ln \gamma_3 = (e_{11} + e_{33} - 2e_{13}) \frac{V_3 \phi_1^2}{RT} \quad (3),$$

where e_{11} , e_{33} and e_{13} represent the solvent-solvent, solute-solute and solvent-solute interaction energies, respectively, the first two terms are unfavorable for solubility and the third term favors the solution process; V_3 is the molar volume of the super-cooled liquid solute and ϕ_1 is the volume fraction of the solvent. As reported in the literature,

for relatively low solubilities x_3 , the term $V_3\phi_1^2/RT$ may be considered constant; thus, γ_3 depends mainly on e_{11} , e_{33} and e_{13} [9]. The contribution of the e_{33} term could be considered as constant in all mixtures [10].

Thermodynamic functions of solution

Apparent standard enthalpy change of solution is obtained from the Eq. (4) by using the mean harmonic temperature (T_{hm}) [calculated as: $T_{hm} = n / \sum_{i=1}^n (1/T)$], where n is the number of temperatures studied [4].

$$\left(\frac{\partial \ln x_3}{\partial (1/T - 1/T_{hm})} \right)_P = -\frac{\Delta_{\text{soln}} H^\circ}{R} \quad (4)$$

The apparent standard Gibbs energy change for the solution process ($\Delta_{\text{soln}} G^\circ$), considering the approach proposed by Krug *et al.* [11], is calculated at T_{hm} by means of:

$$\Delta_{\text{soln}} G^\circ = -R \times T_{hm} \times \text{intercept} \quad (5),$$

where the intercept is obtained from the treatment of $\ln x_3$ as a function of $1/T - 1/T_{hm}$. Finally, the standard apparent entropy change for solution process ($\Delta_{\text{soln}} S^\circ$) is obtained from the respective $\Delta_{\text{soln}} H^\circ$ and $\Delta_{\text{soln}} G^\circ$ values at T_{hm} by using:

$$\Delta_{\text{soln}} S^\circ = \frac{(\Delta_{\text{soln}} H^\circ - \Delta_{\text{soln}} G^\circ)}{T_{hm}} \quad (6),$$

the relative contributions by enthalpy (ζ_H) and entropy (ζ_{TS}) toward the solution process are given by equations 7 and 8 [12-13].

$$\zeta_H = \frac{|\Delta_{\text{soln}} H^\circ|}{|\Delta_{\text{soln}} H^\circ| + |T \Delta_{\text{soln}} S^\circ|} \quad (7)$$

$$\zeta_{TS} = \frac{|T \Delta_{\text{soln}} S^\circ|}{|\Delta_{\text{soln}} H^\circ| + |T \Delta_{\text{soln}} S^\circ|} \quad (8)$$

Preferential solvation

The KBIs are given by the following expressions:

$$G_{1,3} = \int_0^{r_{cor}} (g_{1,3} - 1) 4\pi r^2 dr \quad (9),$$

here $g_{1,3}$ is the pair correlation function for molecules of solvent 1 in the 1 + 2 mixtures around the solute 3, r is the distance between the centers of molecules 3 and 1, and r_{cor} is a correlation distance for which $g_{1,3}(r > r_{cor}) \approx 1$. Thus, for all distances $r > r_{cor}$ up to infinite, the value of the integral is essentially zero. So, the results are expressed in terms of the preferential solvation parameter, $\delta x_{1,3}$, for the solute 3 by the component solvents 1 and 2 [5, 14].

$$\delta x_{1,3} = x_{1,3}^L - x_1 = -\delta x_{2,3} \quad (10)$$

Where x_1 is the mole fraction of 1 in the bulk solvent mixture and $x_{1,3}^L$ is the difference between the local mole fraction of 1 in the near environment of the solute. If $\delta x_{1,3} > 0$ then 3 is preferentially solvated by 1, else by 2, within the correlation volume $V_{cor} = (4\pi/3)r_{cor}^3$, and the bulk mole fraction of 1, x_1 . Values of $\delta x_{1,3}$ are obtainable from those of $G_{1,3}$, and these, in turn from thermodynamic data for the solvent mixture with the solute in it as shown below [6, 15].

Algebraic manipulation of expressions presented by Newman [16] leads to expressions for the Kirkwood-Buff integrals (in $\text{cm}^3 \text{mol}^{-1}$) for the individual solvent components 1 and 2 in terms of thermodynamic quantities [3, 6-7]:

$$G_{1,3} = RT\kappa_T - V_3 + \frac{x_2 V_2 D}{Q} \quad (11)$$

$$G_{2,3} = RT\kappa_T - V_3 + \frac{x_1 V_1 D}{Q} \quad (12)$$

Where κ_T is the isothermal compressibility of the solvent mixtures 1+2 (in GPa^{-1}), V_1 and V_2 are the partial molar solvent volumes in the mixture, and V_3 is the standard partial molar volume of solute in this mixture (in $\text{cm}^3 \text{mol}^{-1}$). The function D is the derivative of the standard molar transfer Gibbs energies of 3 with respect to the solvent composition and the function Q involves the second derivative of the excess molar Gibbs energy of mixing of the two solvents, $G_{1,2}^E$, with respect to the solvent composition (in kJ mol^{-1} , as is RT) [17]:

$$D = \frac{\partial \Delta_r G_{(3,2 \rightarrow 1+2)}^o}{\partial x_2} \quad (13)$$

$$Q = RT + x_1 x_2 \left[\frac{\partial^2 G_{1+2}^E}{\partial x_2^2} \right]_{T,p} \quad (14)$$

Because of the dependence of κ_T on composition this term is not known for all the systems investigated. Moreover, due to the small contribution of $RT \kappa_T$ to the IKBI, the dependence of κ_T on composition will be approximated by [18-19]:

$$\kappa_T = x_1 \kappa_{T,1}^o + x_2 \kappa_{T,2}^o \quad (15),$$

where x_i is the volume fraction of component i in solution and $\kappa_{T,i}^o$ is the isothermal compressibility of the pure component i .

Ben-Naim [20] showed that the preferential solvation parameter can be calculated from the Kirkwood-Buff integrals as follows:

$$\delta x_{1,3} = \frac{x_1 x_2 (G_{1,3} - G_{2,3})}{x_1 G_{1,3} + x_2 G_{2,3} + V_{cor}} \quad (16)$$

The correlation volume, V_{cor} , is obtained by means of the following expression proposed by Marcus [21]:

$$V_{cor} = 2522.5 \left[r_3 + 0.1363 (x_{2,3}^L V_2 + x_{1,3}^L V_1)^{1/3} - 0.085 \right]^3 \quad (17)$$

Where r_3 is the radius of the solute (in nm), calculated as

$$r_3 = \sqrt[3]{\frac{3 \times 10^{21} V_3}{4\pi N_A}} \quad (18)$$

However, the correlation volume requires iteration, because it depends on the local mole fractions [14].

RESULTS AND DISCUSSION

The solubility of 3-chloro-*N*-phenyl-phthalimide (3) in acetone (1) + methanol (2) mixtures (Fig. 2) was taken from the literature [1].

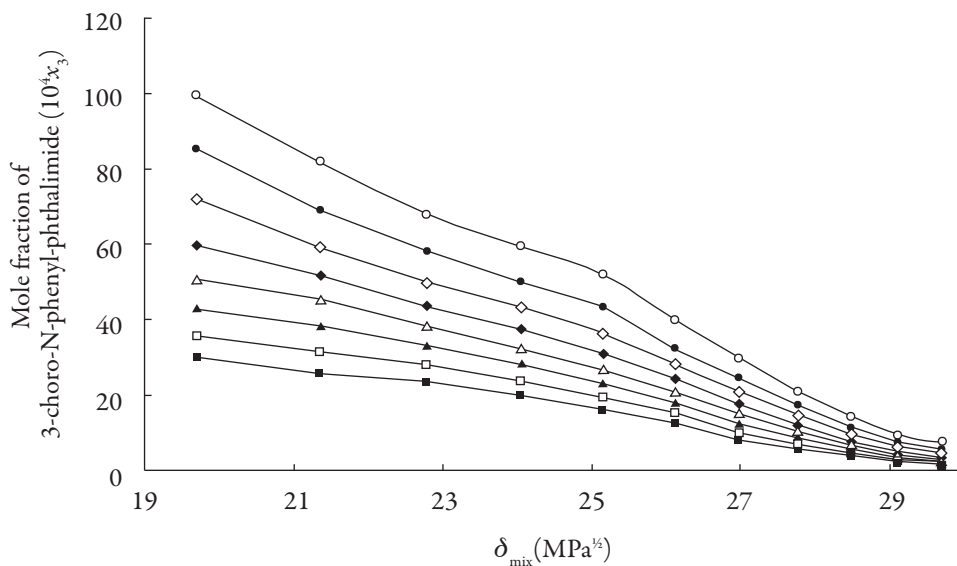


Figure 2. Experimental molar solubility of 3-chloro-*N*-phenyl-phthalimide in acetone + methanol mixtures at different temperatures; (■ = 288.15 K; □ = 293.15 K; ▲ = 298.15 K; △ = 303.15 K; ◆ = 308.15; ◇ = 313.15 K; ● = 318.15 K; and ○ = 323.15 K). Data taken from Xie *et al.* [1].

The solubility increases with temperature in all cases indicating that the dissolution process is endothermic. The highest solubility of 3-chloro-*N*-phenyl-phthalimide expressed as a mole fraction were obtained in near acetone at $T = 323.15$ K, whereas the lowest values were found in pure methanol (2) at 288.15 K (Fig. 2).

Table 1 shows the ideal solubilities expressed as a mole fraction of the solutes (x_3^{id}) calculated by using Eq. (1) with the temperature and heat of fusion of 3-chloro-*N*-phenyl-phthalimide taken from literature, i.e. $T_{fus} = 466.05$ K and $\Delta_{fus}H = 29.14$ kJ mol⁻¹ [22].

On the other hand, Fig. 2 shows the solubility profiles as a function of the polarity of the mixtures, expressed by their solubility parameters (δ_{mix}). For a binary mixture δ_{mix}

is calculated from the solubility parameters of the pure solvents ($\delta_1 = 19.6 \text{ MPa}^{1/2}$ and $\delta_2 = 29.78 \text{ MPa}^{1/2}$ [23]).

The solubility parameter of solute, estimated according to the groups contribution method proposed by Fedors [24], is $\delta_3 = 27.08 \text{ MPa}^{1/2}$ (Table 2), which is higher than the experimental value obtained ($\delta_3 \leq 27.08 \text{ MPa}^{1/2}$). This indicates that the actual polarity of solute is lower than the expected from the additive contribution of its groups, which is lower than the experimental value [25].

Table 1. 3-chloro-N-phenyl-phthalimide activity coefficients as natural logarithms ($\ln \gamma_3$) in ethanol (1) + water (2) cosolvent mixtures at several temperatures.

δ_{mix}	Temperatures (K)							
	288.15	293.15	298.15	303.15	308.15	313.15	318.15	323.15
29.70	0.601	0.458	0.333	0.247	0.156	0.051	-0.040	-0.157
29.12	0.143	0.024	-0.066	-0.121	-0.174	-0.249	-0.329	-0.388
28.49	-0.396	-0.466	-0.520	-0.543	-0.579	-0.642	-0.719	-0.802
27.77	-0.731	-0.847	-0.926	-0.982	-1.017	-1.067	-1.117	-1.183
26.98	-1.116	-1.188	-1.272	-1.342	-1.383	-1.430	-1.472	-1.541
26.12	-1.555	-1.609	-1.644	-1.673	-1.700	-1.724	-1.747	-1.832
25.15	-1.800	-1.847	-1.900	-1.910	-1.943	-1.979	-2.035	-2.100
24.05	-2.002	-2.048	-2.089	-2.103	-2.130	-2.156	-2.179	-2.234
22.79	-2.172	-2.221	-2.256	-2.274	-2.279	-2.293	-2.329	-2.365
21.36	-2.257	-2.334	-2.396	-2.437	-2.452	-2.465	-2.500	-2.555
19.70	-2.405	-2.460	-2.513	-2.550	-2.595	-2.659	-2.709	-2.749
Ideal solubility	2.69 $\times 10^{-4}$	3.06 $\times 10^{-4}$	3.48 $\times 10^{-4}$	3.94 $\times 10^{-4}$	4.45 $\times 10^{-4}$	5.03 $\times 10^{-4}$	5.66 $\times 10^{-4}$	6.37 $\times 10^{-4}$

The activity coefficients of 3-chloro-N-phenyl-phthalimide expressed as natural logarithms are also shown in Table 1. These values were calculated from experimental solubility was taken from Xie *et al.* (2016) [1]) and ideal solubility data (table 1). In the vast majority of cases, γ_3 values were lower than unit (negative logarithmic values) due to the experimental solubilities are greater than the ideal ones in those cosolvent systems (acetone-rich mixtures).

As a qualitative approach, the following analysis could be made based on the energetic quantities and magnitudes described in the Eq. (2): The term e_{11} is highest in neat methanol and methanol-rich mixtures having larger γ_3 values (0.855-1.825) which implies higher e_{11} and lower e_{13} values. On the other hand, in intermediate composition mixtures and acetone-rich mixtures (having γ_3 values <1), the e_{11} values are relatively low but the e_{13} values could not to be so high. Accordingly, the solvation of 3-chloro-N-phenyl-phthalimide could be just a little higher in acetone-rich mixtures.

Table 2. Application of the Fedors' method to estimate internal energy, molar volume, and Hildebrand solubility parameter of 3-chloro-N-phenyl-phthalimide (3).

Group	Group number	V (cm ³ mol ⁻¹)	U (kJ mol ⁻¹)
> N -	1	1 × -9.0	1 × 4.2
> C = O	2	2 × 10.8	2 × 17.4
- Cl	1	1 × 24.0	1 × 11.55
Phenyl	1	1 × 71.4	1 × 31.9
Phenyl (trisubstitute)	1	1 × 33.4	1 × 31.9
Ring closure	1	1 × 16.00	1 × 1.05
	Total	157.4	115.4
	Solubility parameter	$(115400/157.4)^{1/2}$	27.08 MPa ^{1/2}

Thermodynamic functions of solution

From the solubility data, the thermodynamic functions in solution are calculated (Table 3). Over the range of temperatures studied (288.15 to 323.15 K) the heat capacity change of solution may be assumed to be constant, hence $\Delta_{\text{soln}}H^\circ$ should be valid for the mean harmonic temperature, $T_{hm} = 305.27$ K.

Table 3. Apparent thermodynamic functions relative to solution process of 3-chloro-N-phenyl-phthalimide in acetone + methanol cosolvent mixtures at 305.27 K.

x_1^a	$\Delta_{\text{soln}}G^\circ$ (kJ mol ⁻¹)	$\Delta_{\text{soln}}H^\circ$ (kJ mol ⁻¹)	$\Delta_{\text{soln}}S^\circ$ (J mol ⁻¹ K ⁻¹)	$T\Delta_{\text{soln}}S^\circ$ (kJ mol ⁻¹)	ζ_H	ζ_{TS}
0.000	20.3	34.9	48.0	14.6	0.704	0.296
0.058	19.4	30.1	35.1	10.7	0.738	0.262
0.121	18.3	27.1	29.0	8.8	0.754	0.246
0.193	17.2	28.0	35.2	10.7	0.723	0.277
0.272	16.3	28.0	38.2	11.6	0.706	0.294
0.358	15.5	24.2	28.5	8.7	0.735	0.265
0.455	14.8	25.0	33.4	10.2	0.711	0.289
0.565	14.4	23.4	29.7	9.1	0.721	0.279
0.691	14.0	22.6	28.4	8.7	0.723	0.277
0.834	13.6	24.6	36.1	11.0	0.691	0.309
1.000	13.2	26.7	44.2	13.5	0.664	0.336

^a x_1 is the molar fraction of acetone in the cosolvent mixture free of solute.

The standard Gibbs free energy of solution is positive in all cases as is the enthalpy of solution; therefore the process is always endothermic. Figure 3 shows the change of enthalpy versus the mole fraction of acetone. The decreasing enthalpy between pure methanol up to the mixture with $x_1 = 0.121$ indicates that solubility is favored for enthalpy in these mixtures. Besides, from the mixture with $x_1 = 0.121$ up to the mixture with $x_1 = 0.565$ the enthalpy of solution tends to increase and then decrease, for this reason it is not possible to identify the thermodynamics properties driving the solution process. Finally, between the mixture $x_1 = 0.691$ and the pure acetone, the enthalpy increases.

The main contributor to the (positive) standard molar Gibbs energy of solution of 3-chloro-N-phenyl-phthalimide, in all cases, is the (positive) enthalpy ($\zeta_H > 0.754$). The experimental data of thermodynamic functions of solution are collected in Fig. 4. The regions where ($\Delta_{\text{tr}}H^\circ > T\Delta_{\text{tr}}S^\circ > 0$) \equiv sector I; corresponds to enthalpy determined processes [4, 26-27], which is proposed by the equations 7 and 8.

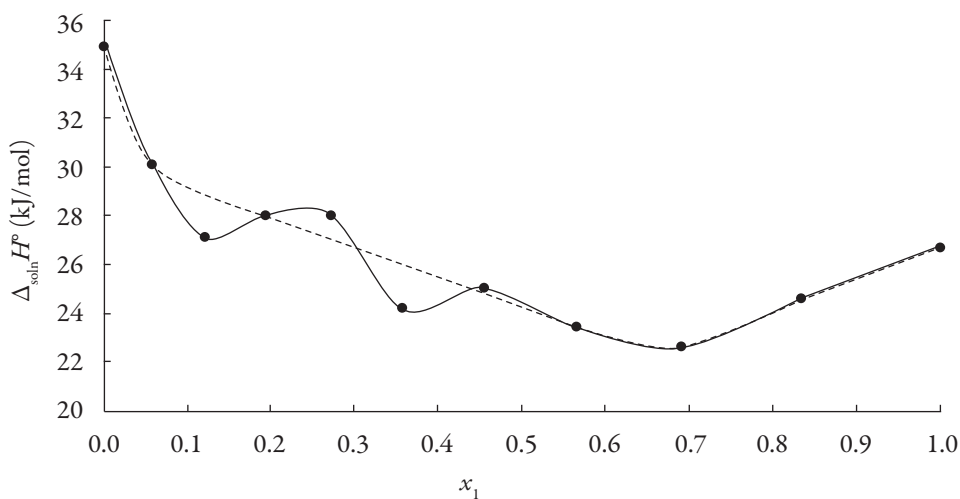


Figure 3. Enthalpy of solution of 3-chloro-N-phenyl-phthalimide in acetone (1) + methanol (2) mixtures at 305.27 K. The dotted lines not consider the mixture with 0.193, 0.272 and 0.455 mole fractions.

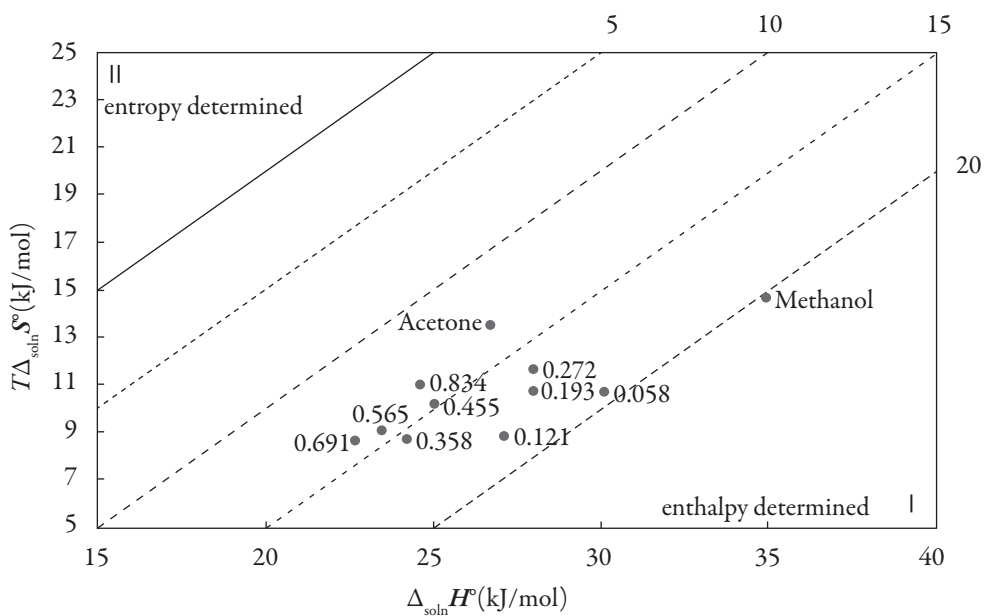


Figure 4. Relationship between the enthalpic and entropic terms of solution of 3-chloro-N-phenyl-phthalimide in acetone (1) + methanol (2) mixtures at 305.27 K. The isoenergetic curves of $\Delta_{\text{soln}} G^\circ$ function are marked by dotted lines.

Thermodynamic functions of transfer

In order to verify the effect of co-solvent composition on the thermodynamic function driving the solution process, Fig. 5 collects the thermodynamic functions of transfer of 3-chloro-N-phenyl-phthalimide (3) from the more polar solvents to the less polar ones. These new functions were calculated as the differences between the thermodynamic quantities of solution obtained in the less polar mixtures and the more polar ones, by means of:

$$\Delta_{\text{tr}}F^{\circ} = \Delta_{\text{soln}}F^{\circ}_{\text{less polar}} - \Delta_{\text{soln}}F^{\circ}_{\text{more polar}} \quad (19)$$

Where $\Delta_{\text{soln}}F^{\circ}$ represents the thermodynamic functions ($\Delta_{\text{soln}}G^{\circ}$, $\Delta_{\text{soln}}H^{\circ}$ or $\Delta_{\text{soln}}S^{\circ}$). This procedure is the same followed previously in other studies reported by Holguín *et al.* and Delgado *et al.* [28-29].

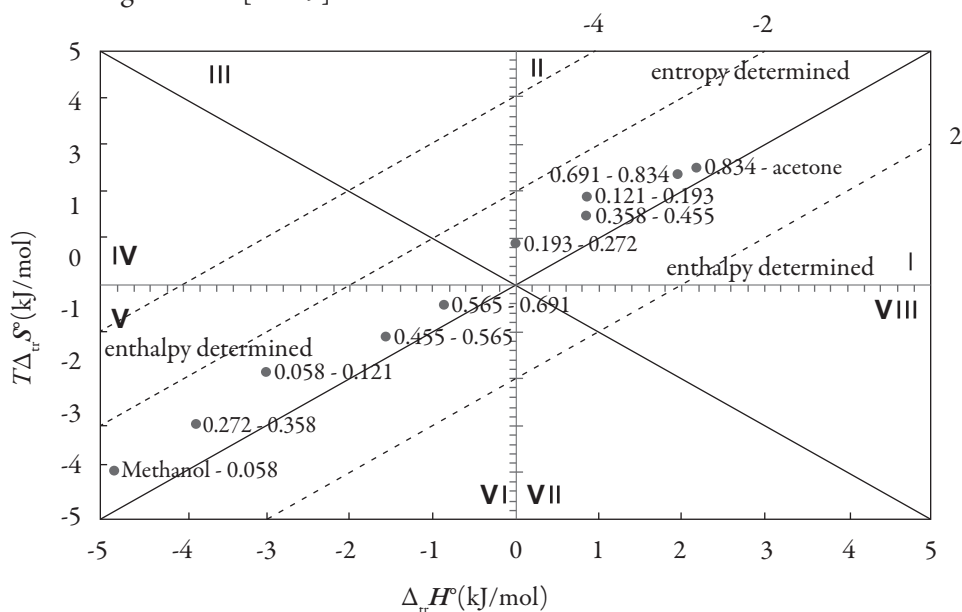


Figure 5. Relationship between the enthalpy and entropic terms of transfer functions of 3-chloro-N-phenyl-phthalimide from more polar solvents to less polar solvents at 305.27 K. The isoenergetic curves of $\Delta_{\text{tr}}G^{\circ}$ function are marked by dotted lines.

The regions where $(\Delta_{\text{tr}}H^{\circ} > T\Delta_{\text{tr}}S^{\circ} > 0) \equiv$ sector I; $(\Delta_{\text{tr}}H^{\circ} < 0; T\Delta_{\text{tr}}S^{\circ} > 0; |\Delta_{\text{tr}}H^{\circ}| > |T\Delta_{\text{tr}}S^{\circ}|) \equiv$ sector IV and $(\Delta_{\text{tr}}H^{\circ} < 0; T\Delta_{\text{tr}}S^{\circ} < 0; |\Delta_{\text{tr}}H^{\circ}| > |T\Delta_{\text{tr}}S^{\circ}|) \equiv$ sector V corresponds to enthalpy determined processes. The regions of the diagram where $(T\Delta_{\text{tr}}S^{\circ} > \Delta_{\text{tr}}H^{\circ} > 0) \equiv$ sector II correspond to entropy determined processes [4, 26-27]. A schematic depiction of these relationships is given in figure 5.

So, the process of transfer in acetone-rich mixtures may indicate that the 3-chloro-N-phenyl-phthalimide molecule interacts more strongly with the acetone, however in all cases, the behavior is very random.

Enthalpy-entropy compensation of 3-chloro-N-phenyl-phthalimide

There are several reports in the literature that have demonstrated enthalpy-entropy compensation effects for the solubility of drugs in aqueous co-solvent mixtures. This analysis has been used in order to identify the mechanism of the co-solvent action. Weighted graphs of $\Delta_{\text{soln}}H^\circ$ as a function of $\Delta_{\text{soln}}G^\circ$ at the mean temperature allow such an analysis [30-31].

Figure 6 shows that 3-chloro-N-phenyl-phthalimide (3) in the acetone (1) + methanol (2) solvent system presents a non-linear behavior of $\Delta_{\text{soln}}H^\circ$ vs. $\Delta_{\text{soln}}G^\circ$ with a variable negative slope from pure acetone up to $x_1 = 0.691$. Beyond this composition a variable positive slope is obtained with exception of mixtures with $x_1 = 0.12$, $x_1 = 0.272$ and $x_1 = 0.36$, showing a non-common trend in these systems. Accordingly, the driving mechanism for solubility is the entropy in the former case, whereas in the latter case the driving mechanism is the enthalpy, probably due to better solvation of the 3-chloro-N-phenyl-phthalimide by acetone molecules.

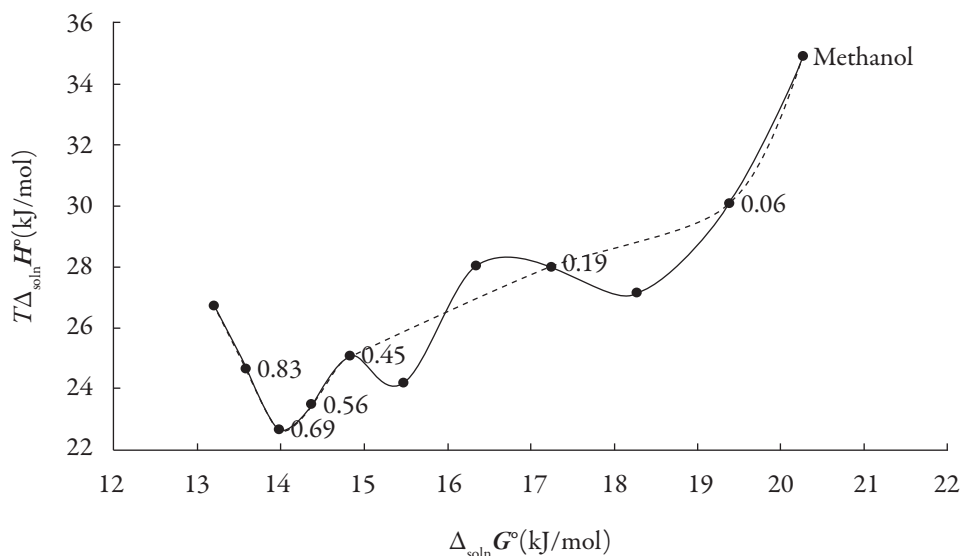


Figure 6. $\Delta_{\text{soln}}H^\circ$ vs. $\Delta_{\text{soln}}G^\circ$ enthalpy-entropy compensation plot for solubility of 3-chloro-N-phenyl-phthalimide in acetone + methanol cosolvent mixtures at 305.27 K. The dotted lines represent a behavior without considering the mixtures with 0.193, 0.272 and 0.455 mole fractions of acetone.

Preferential solvation

Standard molar Gibbs energy of transfer of 3-chloro-N-phenyl-phthalimide from neat methanol to acetone + methanol mixtures is calculated and correlated to a third grade polynomial from the drug solubility data by using equation (13). Figure 7 shows the Gibbs energy of transfer behavior at 323.15 K.

$$\Delta_{\text{tr}} G_{3,2 \rightarrow 1+2}^0 = RT \ln \left(\frac{x_{3,2}}{x_{3,1+2}} \right) = 0.217 - 19.307x_1 + 20.778x_1^2 - 8.6271x_1^3 \quad (20)$$

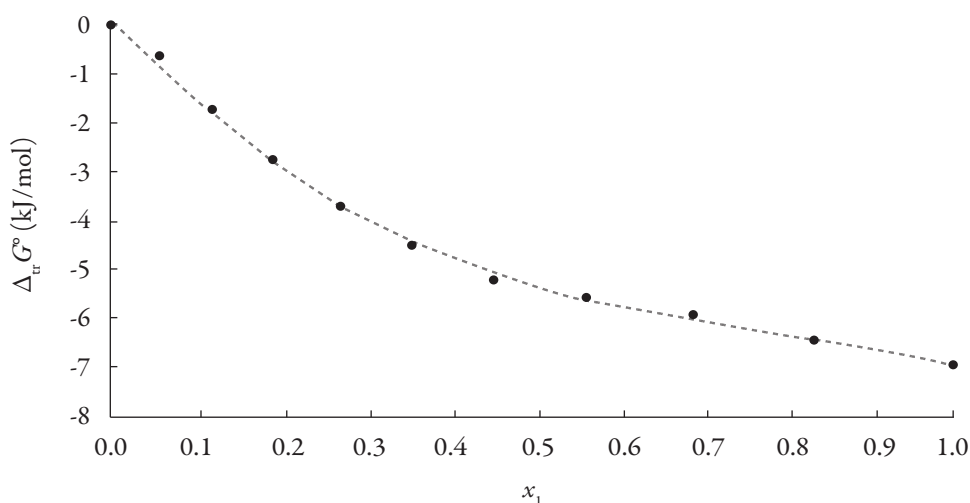


Figure 7. Gibbs energy of transfer of 3-chloro-N-phenyl-phthalimide from neat methanol to acetone + methanol co-solvent mixtures at 323.15 K.

Thus, D values are calculated from the first derivative of polynomial models (Eq. 20) solved according to the co-solvent mixtures composition. This procedure was done varying by 0.05 in mole fraction of methanol but in the following tables the respective values are reported varying only by 0.10.

$$D = \left(\frac{\partial \Delta_{\text{tr}} G_{(3,2 \rightarrow 1+2)}^0}{\partial x_2} \right)_{T,p} = -19.307 + 41.556x_1 - 25.881x_1^2 \quad (21)$$

In order to calculate the Q values the excess molar Gibbs energies of mixing $G_{1,2}^{\text{Exc}}$ at 323.15 K were used as is reported by Marcus [18], the isothermal compressibility (κ_T) is given, as a good approximation, by the linear expression: $x_1 \kappa_{T1} + x_2 \kappa_{T2}$ ($\kappa_{T1} = 1,324 \text{ GPa}^{-1}$;

($\kappa_{T2} = 1.248 \text{ GPa}^{-1}$) [21] and the partial molar volumes can be replaced by the molar volumes of the pure substances [32-34].

$$G_{1,2}^{Exc} = x_1 x_2 (1725 - 37(1 - 2x_1)) \quad (22)$$

The application of the IKBI method with the gyration radius $r = 0.397 \text{ nm}$ leads to the preferential solvation parameter, $\delta x_{1,3}$ for acetone around 3-chloro-N-phenyl-phthalimide which is shown in Fig. 8 at 323.15 K. The values of $\delta x_{1,3}$ vary non-linearly with the proportion of acetone in the alcoholic mixtures (figure 8). The addition of acetone to methanol causes a negative change in $\delta x_{1,3}$ from pure methanol up to the 0.35 in molar fraction of acetone reaching minimum values near to -0.018 at 0.15 in molar fraction of acetone at 323.15 K. In this composition, methanol is preferred over acetone around the 3-chloro-N-phenyl-phthalimide.

The local mole fractions of methanol are greater than those of acetone from pure methanol up to 0.35 mole fractions of acetone and minors beyond this up to pure acetone. From the preferential solvation results, it may be conjectured that, in intermediate compositions and in acetone-rich mixtures, 3-chloro-N-phenyl-phthalimide is acting as a Lewis base with acetone molecules because it is more acid than methanol (the Kamlet-Taft hydrogen bond acceptor parameters are $\beta = 0.66$ for methanol and 0.507 for acetone [35]).

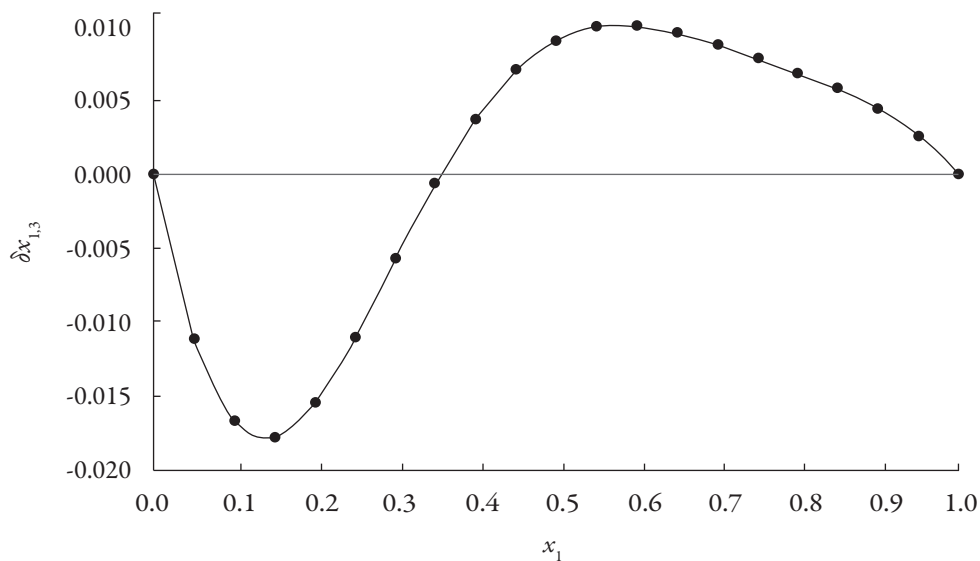


Figure 8. $\delta x_{1,3}$ values 3-chloro-N-phenyl-phthalimide in acetone + methanol co-solvent mixtures at 323.15 K.

CONCLUSIONS

From this work it can be concluded that the solution process of 3-chloro-N-phenylphthalimide (3) in acetone (1) + methanol (2) mixtures is endothermic. A nonlinear enthalpy–entropy compensation was found for this solute in this solvent system. In this context, entropy-driving was found for the solution process in rich-acetone mixtures, whereas, for mixtures methanol-rich enthalpy-driving was found. On the other hand, 3-chloro-N-phenylphthalimide is preferentially solvated for methanol in mixtures more polar and preferentially solvated for acetone in minus polar ones.

DISCLOSURE STATEMENT

No potential conflict of interest was reported by the authors.

REFERENCES

1. Y. Xie, H. Shi, C. Du, Y. Cong, J. Wang, H. Zhao, Thermodynamic models for determination of 3-chloro-N-phenylphthalimide solubility in binary solvent mixtures of (acetone, ethyl acetate or 1,4-dioxane + methanol), *J. Chem. Thermodyn.*, **100**, 22 (2016).
2. D.R. Delgado, F. Martínez, M.A.A. Fakhree, A. Jouyban, Volumetric properties of the glycerol formal+ water cosolvent system and correlation with the Jouyban-Acree model, *Phys. Chem. Liq.*, **50**, 284 (2012).
3. D.R. Delgado, M.A. Peña, F. Martínez, Preferential Solvation of some sulfonamides in propylene glycol + water solvent mixtures according to the IKBI and QLQC methods, *J. Solution Chem.*, **43**, 360 (2014).
4. D.I. Caviedes Rubio, G.A. Rodríguez-Rodríguez, D.R. Delgado, Thermodynamic study of the solubility of naproxen in some 2-propanol + water mixtures, *Revista Fac. Ciencias B.*, **12**, 48 (2016).
5. D.I. Caviedes Rubio, R.G. Sotomayor, D.R. Delgado, Solvatación preferencial de la naringina en mezclas cosolventes etanol + agua mediante el método de las integrales inversas de Kirkwood-Buff, *Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm.*, **44**, 220 (2015).
6. D.R. Delgado, O.A. Almanza, F. Martínez, M.A. Peña, A. Jouyban, W.E. Acree Jr., Solution thermodynamics and preferential solvation of sulfamethazine in (methanol + water) mixtures, *J. Chem. Thermodyn.*, **97**, 264 (2016).

7. D.R. Delgado, G.A. Rodríguez, F. Martínez, Thermodynamic study of the solubility of sulfapyridine in some ethanol + water mixtures, *J. Mol. Liq.*, **177**, 156 (2013).
8. D.R. Delgado, F. Martínez, Solution thermodynamics of sulfadiazine in some ethanol+ water mixtures, *J. Mol. Liq.*, **187**, 99 (2013).
9. D.R. Delgado, F. Martínez, Solubility and preferential solvation of sulfadiazine in methanol+ water mixtures at several temperatures, *Fluid Phase Equilib.*, **379**, 128 (2014).
10. D.R. Delgado, F. Martínez, Solubility and preferential solvation of sulfamerazine in methanol + water mixtures at several temperatures, *J. Solution Chem.*, **44**, 360 (2015).
11. R.R. Krug, W.G. Hunter, R.A. Grieger, Enthalpy-entropy compensation. 2. Separation of the chemical from the statistical effect, *J. Phys. Chem.*, **80**, 2341 (1976).
12. D.R. Delgado, E.F. Vargas, F. Martínez, Thermodynamic study of the solubility of procaine HCl in some ethanol + water cosolvent mixtures, *J. Chem. Eng. Data*, **55**, 2900 (2010).
13. D.R. Delgado, A. Romdhani, F. Martínez, Solubility of sulfamethizole in some propylene glycol + water mixtures at several temperatures, *Fluid Phase Equilib.*, **322**, 113 (2012).
14. D.R. Delgado, E.F. Vargas, F. Martínez, Preferential solvation of xylitol in ethanol + water solvent mixtures according to the IKBI and QLQC methods, *Rev. Colomb. Quím.*, **42**, 59 (2013).
15. D.R. Delgado, F. Martínez, Preferential solvation of sulfadiazine, sulfamerazine and sulfamethazine in ethanol + water solvent mixtures according to the IKBI method, *J. Mol. Liq.*, **193**, 152 (2014).
16. K.E. Newman, Kirkwood-Buff solution theory: derivation and applications, *Chem. Soc. Rev.*, **23**, 31 (1994).
17. J.A. Lasso, D.I. Caviedes, D.R. Delgado, Preferential solvation of 4-hydroxy-2,5-dimethyl-3(2H)-furanone (DMHF) in ethanol + water mixtures according to IKBI and QLQC methods, *Ingeniería y Región*, **13**, 139 (2015).
18. Y. Marcus, On the preferential solvation of drugs and PAHs in binary solvent mixtures, *J. Mol. Liq.*, **140**, 61 (2008).

19. M.Á Peña, D.R. Delgado, F. Martínez, Preferential solvation of indomethacin in some aqueous co-solvent mixtures, *Chem. Eng. Commun.*, **203**, 619 (2016).
20. A. Ben-Naim, Preferential solvation in two- and in three-component systems, *Cell Biophys.*, **12**, 255 (1988).
21. Y. Marcus, "Solvent mixtures: properties and selective solvation", Marcel Dekker, Inc., New York, 2002.
22. C. Du, R. Xu, S. Han, J. Xu, L. Meng, J. Wang, H. Zhao, Solubility of 3-chloro-N-phenyl-phthalimide, *J. Chem. Thermodyn.*, **96**, 187 (2016).
23. R.F. Fedors, A method for estimating both the solubility parameters and molar volumes of liquids, *Polym. Eng. Sci.*, **14**, 147 (1974).
24. A.F.M. Barton, "Handbook of solubility parameters and other cohesion parameter", 2nd edition, CRC Press, Inc., New York, 1991.
25. D.R. Delgado, F. Martínez, Solubility and solution thermodynamics of sulfamerazine and sulfamethazine in some ethanol + water mixtures, *Fluid Phase Equilib.*, **360**, 88 (2013).
26. G.L. Perlovic, S.V. Kurkov, A.N. Kinchin, A. Bauer-Brandl, Thermodynamics of solutions III: comparison of the solvation of (+)-naproxen with other NSAIDs, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **57**, 411 (2004).
27. G.L. Perlovic, N.N. Strakhova, V.P. Kazachenko, T.V. Volkova, V.V. Tkachev, K.J. Schaper, O.A. Raevsky, Sulfonamides as a subject to study molecular interactions in crystals and solutions: Sublimation, solubility, solvation, distribution and crystal structure, *Int. J. Pharm.*, **349**, 300 (2008).
28. D.R. Delgado, M.A. Ruidiaz, S.M. Gómez, M. Gantiva, F. Martínez, Thermodynamic study of the solubility of sodium naproxen in some ethanol + water mixtures, *Quim. Nova*, **33**, 1923 (2010).
29. A.R. Holguín, D.R. Delgado, F. Martínez, Thermodynamic study of the solubility of triclocarban in ethanol + propylene glycol mixtures, *Quim. Nova*, **35**, 280 (2012).
30. P. Bustamante, S. Romero, A. Peña, B. Escalera, A. Reillo, Enthalpy-entropy compensation for the solubility of drugs in solvent mixtures: paracetamol, acetanilide, and nalidixic acid in dioxane-water, *J. Pharm. Sci.*, **87**, 1590 (1998).

31. M. Meloun, Z. Ferencíková, Enthalpy-entropy compensation for some drugs dissociation in aqueous solutions, *Fluid Phase Equilib.*, **328**, 31 (2012).
32. L.P. Pirila-Honkanen, P.A. Ruostesuo, Thermodynamic and spectroscopic properties of 2-pyrrolidinones. 1. Excess molar volumes of 2-pyrrolidinone + dichloromethane, + dimethyl sulfoxide, + acetone, + 2-propanol, and + water, *J. Chem. Eng. Data*, **32**, 303 (1987).
33. G. Gonfa, M.A Bustam, N. Muhammad, S. Ullah, Density and excess molar volume of binary mixture of thiocyanate-based ionic liquids and methanol at temperatures 293.15-323.15 K, *J. Mol. Liq.*, **211**, 734 (2015).
34. Y. Marcus, "The properties of solvents", John Wiley & Sons, Inc., New York, 1998.
35. M.J. Kamlet, R.W. Taft, The solvatochromic comparison method. I. The beta-scale of solvent hydrogen-bond acceptor (HBA) basicities, *J. Am. Chem. Soc.*, **98**, 377 (1976).

HOW TO CITE THIS ARTICLE

G.A.M. Areiza-Aldana, A. Cuellar-Lozano, N.A. Peña-Carmona, D.I. Caviedes-Rubio, A. Mehrdad, A.H. Miri, G.A. Rodríguez-Rodríguez, D.R. Delgado, Solution thermodynamics and preferential solvation of 3-chloro-N-phenyl-phthalimide in acetone + methanol mixtures, *Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm.*, **45**(2), 256-274 (2016).

Efecto del aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* sobre *Porphyromonas gingivalis* cultivada *in vitro*

Diego M. Bonilla¹, Yulitza Mendoza¹, Campo E. Moncada¹, Ozkarina Murcia¹,
Ángela P. Rojas^{2*}, Jairo Calle^{2†}, Roberto Pinzón^{2**}, Lina Nerio²

¹Facultad de Odontología, Universidad Nacional de Colombia, Sede Bogotá, Cra. 30 N. ° 45-03, Bogotá D. C., Colombia.

²Departamento de Farmacia, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, Sede Bogotá, Cra. 30 N. ° 45-03, Bogotá D. C., Colombia.

*Correo electrónico: aprojasr@unal.edu.co

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

Recibido para evaluación: 23 de diciembre de 2014

Aceptado para publicación: 28 de junio de 2016

RESUMEN

El interés por los productos naturales como fuente de agentes antimicrobianos ha ido en aumento. Estudios previos han demostrado que extractos de plantas pueden inhibir la proliferación bacteriana en la cavidad oral. El objetivo de este estudio fue determinar la susceptibilidad *in vitro* de *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 frente al aceite esencial de *Rosmarinus officinalis*. Para la evaluación de la actividad antimicrobiana del aceite esencial se utilizó el método cuantitativo de dilución en agar, descrito por Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) para bacterias anaerobias. El aceite esencial de *R. officinalis* demostró una concentración mínima inhibitoria (CMI) contra *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 de 1000 µg/ml. Estos resultados sugieren que el aceite esencial podría ser útil como un agente antibacteriano en preparaciones de uso oral.

Palabras clave: *Rosmarinus officinalis*, aceite esencial, *Porphyromonas gingivalis*.

SUMMARY

Effect of essential oil of *Rosmarinus officinalis* on *Porphyromonas gingivalis* cultivated *in vitro*

The interest in natural products as a source of antimicrobial agents has been increasing. Previous studies have shown that plant extract may inhibit bacterial growth in the oral cavity. The aim of this study was to determine the *in vitro* susceptibility of *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 against the essential oil of *Rosmarinus officinalis*. To evaluate the antimicrobial activity of the essential oil, quantitative agar dilution method described by the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) for anaerobic bacteria was used. The essential oil of *R. officinalis* showed a minimum inhibitory concentration (MIC) of 1000 µg/ml against *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277. These results suggest that essential oil of *R. officinalis* may be useful as an antibacterial agent in oral preparations.

Keywords: *Rosmarinus officinalis*, essential oil, *Porphyromonas gingivalis*.

INTRODUCCIÓN

La enfermedad periodontal comprende un grupo de patologías causadas por la acumulación de bacterias, que pueden llegar a comprometer los tejidos que rodean el diente. Existen factores de riesgo que incrementan la enfermedad periodontal como: diabetes *mellitus*, enfermedades cardiovasculares, embarazo, poca higiene oral y el estrés [1].

Se estima que la diversidad microbiana de la cavidad oral comprende cerca de 500 especies [2]. Los microorganismos más frecuentemente identificados como agentes patógenos periodontales incluyen siete especies anaeróbicas: *Porphyromonas gingivalis*, *Bacteroides forsythus*, *Treponema denticola*, *Prevotella intermedia*, *Fusobacterium nucleatum*, *Eubacterium*, y espiroquetas, y tres especies microaerofílicas: *Actinobacillus ctinomycetemcomitans*, *Campylobacter rectus*, y *Eikenella corrodens* [3]. Se han identificado tres microorganismos: *T. forsythia*, *P. gingivalis* y *T. denticola*, como los patógenos más fuertemente asociados con la enfermedad periodontal severa, por causar sangrado y daño en tejidos [4]. Además de la enfermedad periodontal, *P. gingivalis* ha demostrado estar relacionada con otras patologías de alta prevalencia como la artritis reumatoidea [5-6] y la aterosclerosis [7].

El tratamiento de la enfermedad periodontal puede ser de tipo quirúrgico o no quirúrgico, conforme a la severidad de la patología. En el segundo caso se opta por un plan de

limpieza, tratamiento farmacológico con antibióticos (doxiciclina, metronidazol, amoxicilina-clavulanato de potasio, ciprofloxacina, tetraciclinas o azitromicina) [8] y el uso de enjuagues bucales antisépticos. Los agentes antibacterianos más utilizados en formulaciones antisépticas incluyen: triclosan, peróxido de hidrógeno y aceites esenciales [9].

En la actualidad se ha incrementado el interés por los productos naturales como fuente de agentes antimicrobianos. Estudios anteriores han demostrado el efecto antibacteriano de extractos de plantas y aceites esenciales contra bacterias orales, entre los más utilizados se encuentra el aceite esencial del té verde (*Melaleuca alternifolia*), el cual ha demostrado actividad antibacteriana contra *Streptococcus mutans* y *Porphyromonas gingivalis*, así como el aceite esencial de *Artemisia lavandulaefolia* que inhibe especialmente, microorganismos anaerobios orales [10]. Una de las plantas más utilizadas de forma empírica es el romero (*Rosmarinus officinalis*), el cual se usa en el tratamiento de inflamaciones de la boca en forma tópica y como enjuague bucal para la higiene oral; este se utiliza en forma de infusión partiendo de las partes aéreas de la planta.

Varios estudios realizados con el aceite esencial del romero han comprobado su efecto contra microorganismos Gram-negativos, Gram-positivos y microorganismos resistentes. Jiang y colaboradores demostraron la actividad antimicrobiana del aceite esencial de *R. officinalis* sobre tres bacterias Gram-positivas: *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus* y *Bacillus subtilis*; tres bacterias Gram-negativas: *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli* y dos hongos: *Candida albicans* y *Aspergillus niger* [11]. Bernardes y colaboradores [12] también demostraron la actividad antibacteriana del aceite contra *Streptococcus mutans*, *S. salivarius*, *S. sobrinus*, *S. mitis*, *S. sanguinis*, y *Enterococcus faecalis*, microorganismos presentes en la cavidad oral.

A pesar de la amplia disponibilidad de antibióticos de uso clínico, aún es indispensable continuar con la búsqueda de nuevos agentes antimicrobianos que permitan el tratamiento contra microorganismos patógenos resistentes. Ardila y colaboradores observaron resistencias a amoxicilina, clindamicina y metronidazol de cepas aisladas de *P. gingivalis* en pacientes con enfermedad periodontal [13] y Jacinto, al estudiar la sensibilidad de algunos microorganismos anaeróbicos orales encontró que *Prevotella intermedia/nigrescens* es resistente a la Penicilina G [14]; ambas especies son de importancia en la enfermedad periodontal.

En este estudio se analiza la susceptibilidad *in vitro* de *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 frente al aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* empleando el método cuantitativo de dilución en agar descrito por el Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) para bacterias anaerobias.

METODOLOGÍA

Extracción del aceite

El material vegetal fue recolectado de los cultivos existentes en la Facultad de Agronomía de la Universidad Nacional de Colombia para el proyecto *Plantas aromáticas*. La extracción del aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* se realizó mediante el método de destilación por arrastre con vapor a partir de las hojas de la planta.

Caracterización fisicoquímica

La determinación del índice de refracción se realizó por medio del refractómetro de Abbe AusJENA, la densidad del aceite esencial se obtuvo utilizando un picnómetro de 5 ml y la determinación de la rotación óptica a través de un polarímetro de Laurent. Todas las mediciones fueron realizadas a 22 °C.

Perfil cromatográfico

Se realizó el perfil cromatográfico del aceite esencial de *R. officinalis* utilizando cromatografía en capa delgada (CCD) con el fin de identificar qué tipo de compuestos se encuentran en el aceite. Las placas fueron preparadas usando Silicagel 60 (Merck) como fase estacionaria. Se utilizaron dos tipos de fase móvil, tolueno-acetato de etilo 93:7 y cloruro de metileno. La muestra se aplicó a 0,5 cm del solvente en varios puntos de origen y se utilizaron dos tipos de reveladores: vainillina-ácido sulfúrico y anisaldehído-ácido sulfúrico. Para las placas reveladas con vainillina-ácido sulfúrico, se asperjó sobre la placa vainillina al 1% en etanol (solución I) seguida inmediatamente de ácido sulfúrico al 10% en etanol (solución II). Después de calentar a 110 °C por 5 minutos se calculó el factor de retención (Rf) de las manchas reveladas.

El reactivo anisaldehído-ácido sulfúrico fue preparado con 0,5 ml de anisaldehído mezclado con 10 ml de ácido acético glacial, seguido por 85 ml de metanol y 5 ml de ácido sulfúrico concentrado, en ese orden. Las placas que se revelaron con este reactivo fueron calentadas a 100 °C por 5 minutos después de esparcir el reactivo sobre la placa [15]. Finalmente, se calculó el factor de retención (Rf) para las manchas de las sustancias separadas.

Actividad antimicrobiana

Cepa bacteriana y condiciones de cultivo

La cepa bacteriana usada fue *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277, partiendo de un cultivo en fase exponencial de crecimiento. Se utilizó una concentración de microorganismos de 10⁸ UFC/ml que corresponde al tubo N.º 0,5 de la escala de Mc. Farland, adicionando 100 µl del inóculo sin esparcir en el agar Brucella enriquecido. Después de

10 minutos las cajas se incubaron en un medio anaeróbico durante 7 días a una temperatura de 36 °C empleando una campana hermética y sobres de AnaeroGen (Oxoid®).

Evaluación de la actividad antimicrobiana

La susceptibilidad de *Porphyromonas gingivalis* se determinó por el método de dilución en agar descrito por el Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) para bacterias anaerobias [16]. Se realizaron diluciones de aceite esencial de *R. officinalis* y de metronidazol en etanol 96%, en concentraciones de 12,5 µg/ml a 12000 µg/ml de aceite esencial y de 0,015 µg/ml a 256 µg/ml de metronidazol.

Las diluciones obtenidas fueron inoculadas por triplicado en agar Brucella enriquecido con 5% de sangre, 0,0005 % de Hemina y 0,00005% de Menadiona. Para la determinación de la CMI se tuvo en cuenta la dilución causada por el medio tras agregar el inóculo. Se emplearon controles negativos para descartar posible contaminación del medio y se evaluó el diluyente como blanco.

Determinación de la concentración mínima inhibitoria

La concentración mínima inhibitoria (CMI) fue determinada después del séptimo día de incubación. Para ello se evaluó la concentración de aceite esencial y de metronidazol a la cual no hubo crecimiento aparente del microorganismo en el agar. Una vez determinada la CMI, se realizó una resiembra en medio agar Brucella enriquecido tomando dos concentraciones; una por encima y otra por debajo de la CMI para evaluar el efecto bacteriostático o bactericida del aceite esencial de *R. officinalis* y del metronidazol sobre *P. gingivalis*.

Las concentraciones utilizadas para hallar la CMI del metronidazol fueron tomadas de acuerdo al método para la evaluación de la susceptibilidad antimicrobiana de bacterias anaerobias del CLSI [16].

Análisis estadístico

Se utilizó el método de la t-Student para determinar diferencias significativas entre los promedios extremos de las concentraciones de aceite esencial de romero y metronidazol.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tras la extracción del aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* se obtuvo un rendimiento de 0,67% que se encuentra dentro del rango 0,48 y 1,75% reportado en la literatura para esta especie por Angioni y colaboradores quienes utilizaron el mismo método de extracción [17].

Tabla 1. Propiedades físicas del aceite esencial de *Rosmarinus officinalis*.

Propiedad	Valor
Densidad	0,9116 g/ml
Rotación óptica	(+) 10,5°
Índice de refracción	1,4708

Los resultados de la caracterización se encuentran en la tabla 1, donde se observan propiedades fisicoquímicas útiles en la identificación del aceite esencial de *R. officinalis*. Con el fin de detectar que tipo de compuestos se encuentran en el aceite esencial, se realizó un perfil cromatográfico utilizando cromatografía en capa delgada (CCD). En la figura 1 se observan las manchas obtenidas utilizando vainillina-ácido sulfúrico como revelador universal para la detección de flavonoides, terpenoides y esteroides [18]; y en la figura 2 se observan las manchas obtenidas utilizando anisaldehído-ácido sulfúrico como revelador, también útil para la detección de terpenoides [19].

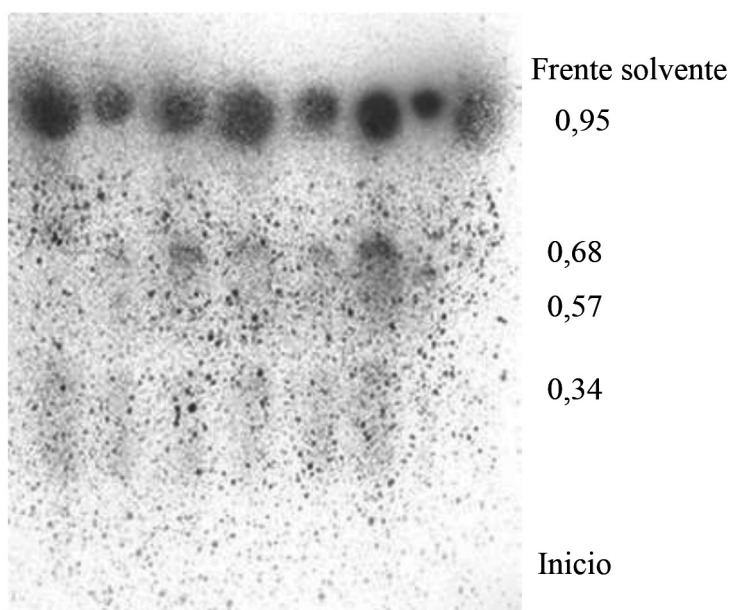
Figura 1. Perfil cromatográfico del aceite esencial de *R. officinalis*.

Figura 1. Perfil cromatográfico del aceite esencial de *R. officinalis*. Fase estacionaria: sílice gel 60, fase móvil: tolueno: acetato de etilo (93:7) y revelador: vainillina-ácido sulfúrico. Mancha violeta rosado ($R_f = 0,34$); mancha rosada ($R_f = 0,57$); mancha violeta ($R_f = 0,68$); mancha violeta intensa ($R_f = 0,95$).

Las placas cromatográficas reveladas muestran manchas violetas relacionadas con la presencia de terpenoides en el extracto, los cuales se han reportado en la literatura como los principales componentes del aceite esencial, en especial del tipo monoterpenos. W. Wang y colaboradores evaluaron la composición del aceite esencial de *R. officinalis* encontrando que entre los 19 compuestos identificados, los principales corresponden los monoterpenos 1,8-cineol, alcanfor, canfeno, α -pineno y β -pineno [20].

En otro estudio realizado por S. Santoyo y colaboradores se identificaron 33 compuestos del aceite esencial extraído con fluidos supercríticos de los cuales el 80% del aceite lo constituían los monoterpenos α -pineno, 1,8-cineol, alcanfor, verbenona y borneol [21]. Los resultados de las placas cromatográficas muestran la presencia de terpenoides a los cuales se le atribuye las manchas violetas indicando la predominancia de este tipo de compuestos en el aceite esencial [15].

Figura 2. Perfil cromatográfico del aceite esencial de *R. officinalis*.

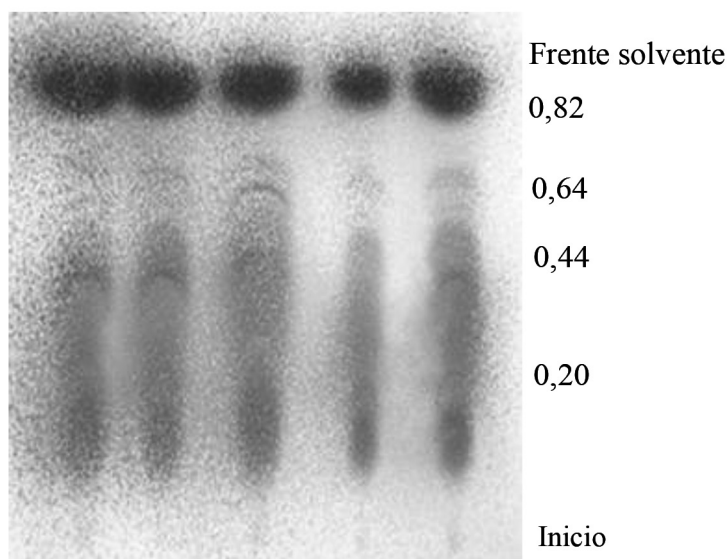


Figura 2. Perfil cromatográfico del aceite esencial de *R. officinalis*. Fase estacionaria: sílice gel 60, fase móvil cloruro de metileno y revelador anisaldehído-ácido sulfúrico. Mancha azul verde ($R_f = 0,20$); mancha azul violeta ($R_f = 0,44$); mancha lila ($R_f = 0,64$); mancha violeta intensa ($R_f = 0,82$).

Adicionalmente, se ha reportado en la literatura la actividad antimicrobiana del aceite esencial de *R. officinalis* del cual gran parte de su actividad se ha atribuido a la presencia de monoterpenos en su composición. S. Santoyo y colaboradores evaluaron la actividad

antimicrobiana del aceite esencial y de estándares de estos compuestos, encontrando que todos presentaron actividad antimicrobiana sobre *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Aspergillus niger* y *Candida albicans*, de los cuales borneol, verbenona y alcanfor presentaron la mayor actividad antimicrobiana sobre las cepas estudiadas [21].

En el presente estudio se evalúa la actividad antimicrobiana del aceite esencial de *R. officinalis* sobre *Porphyromonas gingivalis*, bacteria anaerobia altamente relacionada con la enfermedad periodontal. Para el desarrollo del estudio se utilizó metronidazol como control teniendo en cuenta la metodología para el análisis de la actividad antimicrobiana sobre bacterias anaerobias del CLSI [16]. El metronidazol es un antibiótico nitroimidazol cuya actividad antimicrobiana se debe a que se difunde de manera pasiva dentro del citoplasma de las bacterias anaerobias donde proteínas de transporte le transfieren electrones al grupo nitro, de esa forma se genera un radical libre nitroso que interactúa con el ADN de manera irreversible resultando en la inhibición de la síntesis de ADN y finalmente, en la muerte de la bacteria [22]. Los resultados de la evaluación de la actividad antimicrobiana sobre *Porphyromonas gingivalis* frente al aceite esencial de *R. officinalis* y el metronidazol se muestran en las tablas 2 y 3, respectivamente; donde se observa que la CMI obtenida para metronidazol y el aceite esencial fue de 0,071 µg/ml y 1000 µg/ml, respectivamente; con un coeficiente de variación de 7% y un $p \leq 0,0001$ que rechaza la hipótesis nula de que todos los tratamientos eran semejantes. Los resultados indican que aunque el aceite esencial presenta actividad antimicrobiana, la CMI es inferior al control. La diferencia entre los resultados se debe a que se están evaluando compuestos con posible actividad antimicrobiana, a concentraciones desconocidas y embebidas en la matriz compleja del aceite esencial, frente a un fármaco con un mecanismo de acción conocido y actividad antimicrobiana ampliamente estudiada.

Aun así, se han reportado estudios donde se demuestra la actividad antimicrobiana del aceite esencial de *R. officinalis* contra microorganismos aerobios y anaerobios [23-25]. Entre los microorganismos estudiados se encuentran *Streptococcus mutans*, *Streptococcus pyogenes* [26], *Actinobacillus actinomycesemcomitans*, *Fusobacterium nucleatum*, *Streptococcus sobrinus* [27], los cuales también se ha relacionado con la enfermedad periodontal. Adicionalmente, Takarada y colaboradores en 2004 [27], evaluaron la actividad del aceite esencial de *R. officinalis* sobre *P. gingivalis* utilizando el método de dilución en medio líquido para diferentes cepas y encontraron que para *P. gingivalis*, la CMI del aceite es del 1%.

Tabla 2. Inhibición de crecimiento de la *Porphyromonas gingivalis* empleando diferentes concentraciones de aceite esencial de *R. officinalis*.

Celda	Concentración (µg/ml)																	
	12,5	25	50	100	200	400	600	800	1000	1200	1400	1600	1800	2000	2500	3000	6000	12000
1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Control (-)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

(+) = Crecimiento; (-) = Inhibición de crecimiento.

Tabla 3. Inhibición de crecimiento de la *Porphyromonas gingivalis* empleando diferentes concentraciones de metronidazol.

Celda	Concentración (µg/ml)															
	0,015	0,031	0,062	0,071	0,085	0,100	0,125	0,25	0,5	1	2	4	8			
1	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
2	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
3	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
Control (-)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			

(+) = Crecimiento; (-) = Inhibición de crecimiento.

Las diferencias en los resultados pueden verse influenciadas por las diferencias en el diseño experimental, las diferencias propias de las cepas y el perfil químico del aceite el cual varía con la época del año en la que se recolecta el material vegetal, los fertilizantes utilizados, la posición geográfica, el genotipo, el método de extracción, entre otros factores que influyen en la expresión de metabolitos secundarios [28]. Finalmente, se evaluó el efecto inhibitorio del diluyente del aceite esencial, alcohol al 96%, tablas 2 y 3 comprobándose que este no tiene ningún efecto inhibitorio sobre *P. gingivalis*. Los resultados obtenidos en la evaluación de la actividad antimicrobiana del aceite esencial sobre *Porphyromonas gingivalis* sugieren su utilidad en el tratamiento de la patología periodontal en preparaciones orales.

CONCLUSIÓN

Los resultados obtenidos contribuyen a la caracterización química y al conocimiento de la actividad antimicrobiana del aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* contra *Porphyromonas gingivalis*. El perfil cromatográfico indica la predominancia de compuestos terpénicos en el aceite esencial. La CMI que se encontró para el extracto frente a *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 fue de 1000 µg/ml con un efecto bacteriostático a la concentración de 1000 µg/ml y un efecto bactericida a la concentración de 1200 µg/ml. Para el metronidazol empleado como control se obtuvo una CMI de 0,071 µg/ml. Al ser éste el primer estudio en Colombia que evalúa la actividad del aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* sobre *Porphyromonas gingivalis* se considera que es un aporte importante en la búsqueda de nuevos principios activos que lleven a posteriores estudios en los cuales se evalué la efectividad del aceite esencial sobre la patología periodontal como una alternativa en el tratamiento de la enfermedad asociada a *P. gingivalis*.

CONFLICTO DE INTERESES

Los autores no declaran conflicto de intereses.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al Departamento de Farmacia y a la Facultad de Agronomía de la Universidad Nacional de Colombia por facilitar el desarrollo de este trabajo.

REFERENCIAS

1. E. Koshi, S. Rajesh, P. Koshi, P. Arunima, Risk assessment for periodontal disease, *Journal of Indian Society of Periodontology*, **16**(3), 324 (2012).
2. B. Paster, S. Boches, J. Galvin, R. Ericson, C. Lau, V. Levanos, A. Sahasrabudhe, F. Dewhirst, Bacterial diversity in human subgingival plaque, *Journal of bacteriology*, **183**(12), 3770 (2001).
3. J. Kim, S. Amar, Periodontal disease and systemic condition: A bidirectional relationship, *Odontology*, **94**, 11 (2006).
4. A. Buonavoglia, F. Latronico, C. Pirani, M. Greco, M. Corrente, C. Prati, Symptomatic and asymptomatic apical periodontitis associated with red complex bacteria: clinical and microbiological evaluation, *Odontology*, **101**, 84 (2013).
5. T.R. Mikuls, J.B. Payne, F. Yu, G.M. Thiele, R.J. Reynolds, G.W. Cannon *et al.*, Periodontitis and *Porphyromonas gingivalis* in patients with rheumatoid arthritis, *Arthritis & Rheumatology*, **66**(5), 1090 (2014).
6. J. Koziel, P. Mydel, J. Potempa, The link between periodontal disease and rheumatoid arthritis: An updated review, *Current Rheumatology Reports*, **16**(3), 5 (2014).
7. T. Kurita-Ochiai, M. Yamamoto, Periodontal pathogens and atherosclerosis: implications of inflammation and oxidative modification of LDL, *BioMed Research International*, **2014**, 4 (2014).
8. A. Prakasam, S. Elavarasu, R. Natarajan, Antibiotics in the management of aggressive periodontitis, *Journal of Pharmacy & Bioallied Sciences*, Supplement, S253- S254, (2012).
9. K. Shinada, M. Ueno, Y. Kawaguchi, C. Konishi, S. Takehara, S. Yokoyama, T. Zaitso, M. Ohnuki, F. Clive, Effect of a mouthwash with chlorine dioxide on oral malodor and salivary bacteria: A randomized placebo-controlled 7-day trial, *Trials*, **11**, 15 (2010).
10. E. Palombo, Traditional medicinal plant extracts and natural products with activity against oral bacteria: potential application in the prevention and treatment of oral diseases, *Evidence Based Complementary and Alternative Medicine*, **2011**, 2 (2011).
11. Y. Jiang, N. Wu, Y. Jie Fu, W. Wang, M. Luo, C. Zhao, Y. Gang Zu, X. Liu, Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of Rosemary, *Environmental toxicology and pharmacology*, **32**(1), 63 (2011).

12. W. Bernardes, R. Lucarini, M. Tozatti, M. Souza, M. Andrade, A. da Silva, C. Gomes, A. Miller, P. Pauletti, M. Groppo, W. Cunha, Antimicrobial Activity of *Rosmarinus officinalis* against oral pathogens: Relevance of carnosic acid and carnosol, *Chemistry & Biodiversity*, **7**, 1838 (2010).
13. C. Ardila, M. Granada, I. Guzmán, Antibiotic resistance of subgingival species in chronic periodontitis patients, *Journal of Periodontal Research*, **45**, 559 (2010).
14. R. Jacinto, B. Gomes, C. Ferraz, A. Zaia, F. Souza, Microbiological analysis of infected root canals from symptomatic and asymptomatic teeth with periapical periodontitis and the antimicrobial susceptibility of some isolated anaerobic bacteria, *Oral Microbiology Immunology*, **18**, 290 (2003).
15. H. Wagner, “Drug Analysis Thin Layer Chromatography Atlas”, Springer-Verlag, Berlín, 1984, p. 22-23, 30-31.
16. Clinical and Laboratory Standards Institute, “Methods for antimicrobial susceptibility testing of anaerobic bacteria”, approved standard-8th ed., CLSI document M11-A8, Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, 2012.
17. A. Angioni, A. Barra, E. Cereti, D. Barile, J.D. Coisson, M. Arlorio, S. Dessi, V. Coroneo, P. Cabras, Chemical composition, plant genetic differences, antimicrobial and antifungal activity investigation of the essential oil of *Rosmarinus officinalis* L., *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **52**, 3531 (2004).
18. J. Sánchez, “Estudio de hojas de *Chelonanthus alatus* (Gentianaceae)”, tesis de grado, Universidad Nacional de Colombia, 2011, pp. 11.
19. M. Mastrogiovanni, “Extracción, purificación y caracterización de saponinas de *Quillaja brasiliensis*”, tesis de grado, Universidad de la República, Uruguay, 2012, pp. 17.
20. W. Wang, N. Wu, Y.G. Zu, Antioxidative activity of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil compared to its main components, *Food Chemistry*, **108**(3), 1019-1022 (2008).
21. S. Santoyo, J. Cavero, L. Jaime, E. Ibañez, F.J. Señoráns, G. Reglero, Chemical composition and antimicrobial activity of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil obtained via supercritical fluid extraction, *Journal of Food Protection*, **4**, 790-795 (2005).
22. Micromedex® Solutions. “Metronidazole”, Greenwood Village, Colo: Thomson Micromedex, URL: <http://www.micromedexsolutions.com>, consultado en junio de 2015.

23. A.I. Hussain, F. Anwar, S.A. Shahid, A. Jabbar, S. Mahboob, P.S. Nigam, *Rosmarinus officinalis* essential oil: Antiproliferative, antioxidant and antibacterial activities, *Brazilian Journal of Microbiology*, **41**, 1076 (2010).
24. J. Smullen, M. Finney, G.M. Storey, H.A. Foster, Prevention of artificial dental plaque formation *in vitro* by plant extracts, *Journal of Applied Microbiology*, **113**, 970- 971 (2012).
25. B. Bozin, N. Mimica-Dukic, I. Samojlik, E. Jovin, Antimicrobial and antioxidant properties of rosemary and sage (*Rosmarinus officinalis* L. and *Salvia officinalis* L., Lamiaceae) essential oils, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **55**(19), 7879 (2007).
26. A. Ait-Ouazzou, S. Lorán, M. Bakkali, A. Laglaoui, C. Rota, A. Herrera, R. Pagán, P. Conchello, Chemical composition and antimicrobial activity of essential oils of *Thymus algeriensis*, *Eucalyptus globulus* and *Rosmarinus officinalis* from Morocco, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **91**, 2646-2648 (2011).
27. K. Takarada, R. Kimizuka, N. Takahashi, K. Honma, K. Okuda, T. Kato, A comparison of the antibacterial efficacies of essential oils against oral pathogens, *Oral Microbiology and Immunology* **19**, 61 (2004).
28. A. R. Bilia, F. Santomauro, C. Sacco, M. C. Sesto, R. Donato, Essential oil or *Artemisia annua* L.: An extraordinary component with numerous antimicrobial properties, *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, **2014**, 159819 (2014).

CÓMO CITAR ESTE ARTÍCULO

D.M. Bonilla, Y. Mendoza, C.E. Moncada, O. Murcia, Á.P. Rojas, J. Calle, R. Pinzón, L. Nerio, Efecto del aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* sobre *Porphyromonas gingivalis* cultivada *in vitro*, *Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm.*, **45**(2), 275-287 (2016).

Biotipos y susceptibilidad antimicrobiana de *S. mutans* en niños con y sin caries dental

Fredy Gamboa^{1,2*}, Dabeiba-Adriana García^{2**}, Claudia Patricia Lamby^{2***}, Ana Lucía Sarralde^{2****}.

¹Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias, Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá D.C., Colombia.

²Centro de Investigaciones Odontológicas, Facultad de Odontología, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá D.C., Colombia.

*Correo electrónico: gamboa@javeriana.edu.co

**Correo electrónico: garciad@javeriana.edu.co

***Correo electrónico: clamby@javeriana.edu.co

****Correo electrónico: sarralde@javeriana.edu.co

Recibido para evaluación: 2 de febrero de 2016

Aceptado para publicación: 6 de julio de 2016

RESUMEN

Objetivos: investigar los biotipos de *S. mutans* aislados de niños con y sin caries dental y determinar su susceptibilidad antimicrobiana. **Métodos:** este estudio observacional descriptivo incluyó 206 niños entre los 3 y 5 años de dos preescolares en Bogotá, D. C., Colombia. Después de su aislamiento en agar *Mitis Salivarius Bacitracina*, las cepas *S. mutans* se identificaron por pruebas bioquímicas y se biotipificaron por el sistema api-ZYM. En todos los aislamientos se determinó por el método de dilución en agar la concentración inhibitoria mínima (CIM) de Penicilina, Amoxicilina, Cefazolina, Eritromicina, Clindamicina, Imipenem, Vancomicina y Teicoplanina. **Resultados:** Se encontró *S. mutans* en 30 de los 79 niños sin caries dental (38%) y en 56 de los 127 niños con caries (44,1%). Los niños con caries presentaron un recuento superior de *S. mutans* en comparación con los niños sin caries ($p < 0,05$). En total se identificaron 121 cepas de *S. mutans* en los 86 niños: 43 cepas en los 30 niños sin caries dental y 78 en los 56 niños con caries dental. Las 121 cepas fueron agrupadas en 38 biotipos: 24 en el grupo de caries y 14 en el grupo sin caries. En el grupo de caries los biotipos más frecuentes fueron el XV, XI, XII y XVII, respectivamente, con 26, 12, 11 y 4 cepas y en el grupo sin caries los biotipos más frecuentes fueron el XXVI, XX y XXXVI, respectivamente, con 14, 8 y 7 cepas. Todos los biotipos

fueron altamente sensibles a los antimicrobianos evaluados; el 50 y 90% de las cepas *S. mutans* fueron inhibidas, respectivamente, por concentraciones menores a 0,12 y 1 µg/ml para todos los antimicrobianos estudiados. Para la penicilina, eritromicina e imipenem se obtuvieron los valores promedios más bajos de CIMs. *Conclusiones:* en la población objeto de estudio se encontró una gran diversidad biotípica, los aislamientos fueron altamente susceptibles a los antimicrobianos evaluados y en cada grupo de pacientes se identificaron patrones únicos que podrían indicar una colonización específica.

Palabras clave: Caries dental, *Streptococcus mutans*, perfil biotípico, susceptibilidad antimicrobiana.

SUMMARY

Biotypes and antimicrobial susceptibility of *S. mutans* in children with and without dental caries

Objectives: The main objective was to investigate the biotypes of *S. mutans* isolated from children with and without dental caries and determine its antimicrobial susceptibility. *Methods:* this descriptive observational study included 206 children aged 3 to 5 years of two preschool institutions in Bogota-Colombia. After isolation on agar Mitis Salivarius Bacitracin, *S. mutans* strains were identified by biochemical tests and biotyped by the api-ZYM system. The minimal inhibitory concentrations (MICs) of the *S. mutans* isolates were evaluated against penicillin, amoxicillin, cefazolin, erythromycin, clindamycin, imipenem, vancomycin and teicoplanin by an agar dilution method. *Results:* *S. mutans* was found in 30 of the 79 children without dental caries (38%) and in 56 of the 127 children with caries (44.1%). Children with cavities had a higher count of *S. mutans* compared to children without caries ($p < 0.05$). A total of 121 strains of *S. mutans* were identified in 86 children: 43 strains in 30 children with dental caries and 78 in the 56 children with dental caries. The 121 strains were grouped into 38 biotypes: 24 in the group caries and 14 in the group without caries. In the group caries the most common biotypes were the XV, XI, XII and XVII, respectively, with 26, 12, 11 and 4 strains and the group caries the most common biotypes were the XXVI, XX and XXXVI, respectively, with 14, 8 and 7 strains. All biotypes were highly sensitive to all antimicrobials tested; 50 and 90% of *S. mutans* strains were inhibited by using concentrations lower than 0.12 and 1 µg/ml, respectively, for all antibiotics studied. The lowest MICs average values were obtained for penicillin, erythromycin and imipenem. *Conclusions:* In the study population a wide variety of biotypes was found, isolates were highly sensitive to

antimicrobials evaluated and in each clinical group were identified unique patterns that could indicate a specific colonization.

Keywords: Dental caries, *Streptococcus mutans*, biotypic profile, antimicrobial susceptibility.

INTRODUCCIÓN

La caries dental es una enfermedad infecciosa multifactorial, crónica, localizada, pos eruptiva y transmisible que conlleva a la destrucción del tejido dental duro [1-3]. *Streptococcus mutans*, un microorganismo acidogénico y acidúrico que normalmente se encuentra colonizando la cavidad oral, es considerado el principal microorganismo asociado al desarrollo de caries dental [1-4].

Diferentes hallazgos han mostrado una fuerte correlación entre el número de unidades formadoras de colonias de *S. mutans* en la cavidad oral y la prevalencia e incidencia de caries dental [1, 3-4]. Por otro lado, este microorganismo como resultado de tratamientos dentales puede producir bacteriemias, infecciones sistémicas y endocarditis subagudas [5].

El hecho de reconocer a *S. mutans* como el microorganismo cariogénico más importante en caries dental, ha conducido al diseño de medidas preventivas y de control tendientes a eliminar o reducir su presencia en la cavidad oral [1, 3, 6-8].

La tipificación de cepas bacterianas permite la identificación de clones específicos virulentos dentro de una especie bacteriana y el estudio de los clones bacterianos implicados en un evento epidemiológico. La tipificación con el sistema api-ZYM, basado en la acción enzimática de los microorganismos sobre diferentes sustratos, ha sido de gran valor para tipificar y relacionar cepas *S. mutans* de diferentes orígenes [9-10].

El presente estudio tuvo como objetivo fundamental determinar la diversidad biotípica de *S. mutans* en niños con y sin caries dental y evaluar la susceptibilidad antimicrobiana mediante la concentración inhibitoria mínima en los aislamientos clínicos.

MATERIALES Y MÉTODOS

El presente trabajo contiene información de dos proyectos de investigación, realizados en la Universidad Javeriana y que contaron con la aprobación del Comité de Ética e Investigación de la Facultad de Odontología de la Universidad Javeriana. Los dos proyectos son: 1). Identificación de cepas de *S. mutans* con efectos antagónicos sobre *S. mutans*. ID propuesta 0650, y 2). Descripción del microcosmos bacteriano ligado a

placa dental en niños con y sin caries dental: seguimiento a 3 y 6 meses después de un proceso de educación. ID propuesta 5536.

Aislamiento de *S. mutans*, recuento e identificación

Población de estudio

Con previo consentimiento informado, firmado por padres o tutores y cumpliendo con las exigencias bioéticas de toma y manejo de muestras, se incluyeron en el estudio 206 niños con edades entre los 3 y 5 años, pertenecientes a dos instituciones educativas de Bogotá de estratos socioeconómicos 2 y 3. El diagnóstico clínico y experiencia de caries, en cada uno de los niños, se determinó mediante revisión clínica por un solo investigador, previamente calibrado, quién estableció el índice ceod (dientes cariados, extraídos y obturados) de acuerdo a los criterios dados por la Organización Mundial de la Salud [11].

En ninguno de los niños se tomó radiografías. De los 206 niños, 79 no presentaron caries dental y los 127 restantes presentaron caries con un índice ceod promedio de 3,1 (rango 2-5). Los 206 niños del estudio no presentaron enfermedades infecciosas sistémicas y no estuvieron en tratamiento antimicrobiano por lo menos en los últimos 7 días previos a la toma de la muestra. Las muestras de saliva se tomaron entre las 8 y 10 de la mañana, con el previo compromiso de los niños de no comer en la mañana y de no cepillarse los dientes antes de la toma de muestras. Mediante suave succión con una pipeta plástica, en cada niño se tomó una muestra de saliva (0,2-1,0 ml) de forma espontánea [12], que fue mantenida en hielo hasta ser transportada al laboratorio de bacteriología. La recolección de todas las muestras de saliva estuvo bajo la supervisión y responsabilidad del mismo investigador que determinó la experiencia de caries.

Procesamiento de las muestras

Las muestras de saliva fueron agitadas en vortex durante 15 segundos y serialmente diluidas (1/10, 1/100 y 1/1000) con tampón fosfato 0,05 M. Con el fin de realizar el aislamiento selectivo y recuento de *S. mutans*, 50 µl de las diluciones seriadas se inocularon por duplicado en agar *Mitis Salivarius Bacitracina* (MSB; Difco Laboratories, Detroit, MI) y en agar sangre de cordero.

El agar MSB contiene caseína pancreática digerida, peptona proteosa N.º 3, peptona proteosa, dextrosa, sacarosa 20%, fosfato dipotásico, azul tripan, cristal azul, agar, telurito de Chapman y bacitracina 0,2 U/ml. Las cajas de petri con agar MSB y agar sangre de cordero fueron incubadas anaeróticamente (H₂:CO₂:N₂ 10:10:80) durante 2 días a 37 °C. Después del crecimiento bacteriano en el agar MSB, colonias con características morfológicas de *S. mutans* fueron contadas y expresadas como unidades formadoras de colonia (UFC) por ml de saliva no estimulada [13].

Cinco colonias por muestra con características de *S. mutans* fueron examinadas por la tinción de Gram, prueba de catalasa y sometidas a las siguientes pruebas bioquímicas: fermentación de rafinosa, manitol, melobiosa, trehalosa e inulina; hidrólisis de la esculina en presencia y ausencia de bilis; ureasa; hidrólisis de la arginina; y resistencia a la bacitracina. El perfil bioquímico de *S. mutans* es fermentación positiva de rafinosa, manitol, melobiosa, trehalosa e inulina; hidrólisis negativa de la esculina en la presencia de bilis e hidrólisis positiva de la esculina en ausencia de bilis; ureasa negativa; hidrólisis negativa de la arginina; y resistencia a 2 U de bacitracina. En la identificación de las cepas también se utilizó el sistema comercial Api 20S (bioMérieux, Marcy-l'étoile, France). La prueba Chi cuadrado se utilizó para establecer diferencias en el recuento de *S. mutans* en los grupos con y sin caries.

Biotipificación de las cepas

La tipificación de todas las cepas de *S. mutans* aisladas se realizó utilizando el sistema api-ZYM (bioMérieux, Marcy-l'étoile, France) de acuerdo a las instrucciones de los fabricantes. El sistema api-Zym es un micro-método semicuantitativo de investigación que permite detectar rápida y simultáneamente 19 actividades enzimáticas a partir de pequeñas cantidades de inóculo de la bacteria. El sistema consta de una tira con 20 micropozos o cúpulas (1 control y 19 pruebas), cuya base contiene los sustratos enzimáticos y el buffer.

La base permite el contacto entre la enzima del microorganismo y el sustrato generalmente insoluble. Los sustratos son inoculados con una suspensión densa de bacterias (turbidez 5-6 de McFarland) que rehidrata y ejerce acción enzimática sobre los sustratos contenidos. Los productos finales generados, durante un período de incubación de 4 horas, son detectados a través de reacciones coloreadas producidas después de la adición de reactivos. La biotipificación se realizó por duplicado y los biotipos se asignaron de acuerdo a la acción ejercida por las cepas de *S. mutans* sobre los 19 sustratos del sistema [14]. Después de la identificación y biotipificación las cepas se preservaron a -85°C en caldo tripticosa soya con 3% de glicerol hasta el momento de realizar las técnicas moleculares.

Susceptibilidad antimicrobiana

En las cepas aisladas provenientes de niños con y sin caries dentales se determinó la concentración inhibitoria mínima (CIM) frente a Penicilina, Amoxicilina, Cefazolina, Eritromicina, Clindamicina, Imipenem, Vancomicina y Teicoplanina, por el método de dilución en agar, en concentraciones entre 0,007 y 32 $\mu\text{g/ml}$ [9, 15-16]. Los antimicrobianos Penicilina, Amoxicilina, Cefazolina, Eritromicina, Clindamicina, Vancomicina y Teicoplanina fueron obtenidos de Sigma Chemical (St Louis, MO, USA), e imipenem de Merk (Germany). Con el uso de un replicador se sembraron en el agar Wilkins-Chalgren

suspensiones de 10^5 UFC/ml de las cepas a evaluar. Después de 48 horas de incubación a 37 °C en atmósfera anaeróbica ($H_2:CO_2:N_2$ 10:10:80), la CIM se determinó como la concentración de antimicrobiano más baja que inhibe el crecimiento del organismo evaluado.

RESULTADOS

Aislamiento e identificación de *S. mutans*.

La experiencia de caries dental en los niños fue de 61,6% (127/206) y *S. mutans* se encontró en 30 de los 79 niños sin caries dental (frecuencia de 38 %) y en 56 de los 127 niños con caries dental (frecuencia de 44,1 %) (ver tabla 1). En total se identificaron 121 cepas de *S. mutans* en los 86 niños (teniendo en cuenta que en algunos niños se identificaron más de 1 cepa): 43 cepas en los 30 niños sin caries dental y 78 cepas en los 56 niños con caries dental. El recuento de *S. mutans* en la población en general fue variado y estuvo desde 10^3 hasta por arriba de 10^7 UFC/ml. Los niños con caries presentaron un recuento superior de *S. mutans* en comparación con los niños sin caries y las diferencias en el recuento fueron estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

Tabla 1. Presencia de *S. mutans* en niños con y sin caries dental

Presencia de <i>S. mutans</i>	Número de niños		Total (%)
	Con caries	Sin caries	
Positiva	56	30	86 (42)
Negativa	71	49	120 (58)
Total	127	79	206 (100)

Biotipos de *S. mutans*.

Los biotipos se asignaron de acuerdo a una previa estandarización y teniendo en cuenta la acción enzimática de las cepas sobre los 19 sustratos del sistema Api-ZYM [10]. En las tablas 2 y 3 se presentan los biotipos encontrados en las 121 cepas de *S. mutans* aisladas de niños con y sin caries. El rango de actividad de estos microorganismos está reflejado en los 38 biotipos encontrados: 24 en el grupo de caries y 14 en el grupo sin caries. Los dos grupos presentaron en común los biotipos VIII, XX y XXIV (ver tablas 2 y 3). En el grupo de caries los biotipos más frecuentes fueron el XV, XI, XII y XVII, respectivamente, con 26, 12, 11 y 4 cepas. En el grupo sin caries los biotipos más frecuentes fueron el XXVI, XX y XXXVI, respectivamente, con 14, 8 y 7 cepas; los demás biotipos se presentaron con una frecuencia de 1 cepa.

Tabla 2. Presencia de los diferentes biotipos caracterizados por el sistema api-ZYM y encontrados en las 78 cepas *S. mutans* aisladas en niños con caries dental.

Identificación de la cepa*	Biotipo**	Frecuencia (%)
11C, 15C, 30C1, 136C, 143C1, 145C1, 150C, 154C2, 160C, 161C, 163C1, 168C, 175C1, 176C, 183C, 186C, 187C, 192C, 194C1, 197C1, 200C, 205C, 206C1, 207C, 208C, 220C	XV	N=26 (33,3%)
10C, 30C, 85C, 154C3, 180C, 182C1, 193C, 195C1, 196C, 201C, 209C, 214C,	XI	N=12 (15,4%)
14C, 131C, 161C1, 163C, 174C, 175C, 178C, 183C1, 193C1, 206C, 209C1	XII	N=11 (14,1%)
171C	I	N=1 (1,28%)
173C	II	N=1 (1,28%)
152C1	III	N=1 (1,28%)
185C	IV	N=1 (1,28%)
197C2	V	N=1 (1,28%)
218C1	VI	N=1 (1,28%)
217C1, 217C2	VII	N=2 (2,56%)
152C2	VIII	N=1 (1,28%)
140C	IX	N=1 (1,28%)
190C2	X	N=1 (1,28%)
189C	XIII	N=1 (1,28%)
101C2, 171C1, 216C	XIV	N=3 (3,85%)
154C1, 219C	XVI	N=2 (2,56%)
100C1, 145C, 195C2	XVII	N=3 (3,85%)
147C1, 147C2, 147C3	XVIII	N=3 (3,85%)
143C2	XIX	N=1 (1,28%)
148C	XX	N=1 (1,28%)
101C1	XXI	N=1 (1,28%)
167C	XXII	N=1 (1,28%)
190C1	XXIII	N=1 (1,28%)
194C	XXIV	N=1 (1,28%)

*La designación de la cepa se hizo de acuerdo al número dado al paciente.

**El biotipo se asignó de acuerdo al comportamiento enzimático de la bacteria.

Tabla 3. Presencia de los diferentes biotipos caracterizados por el sistema api-ZYM y encontrados en las 43 cepas *S. mutans* aisladas en niños sin caries dental.

Identificación de la cepa*	Biotipo**	Frecuencia (%)
1SC1, 26SC1, 29SC, 32SC, 41SC, 48SC1, 51SC, 54SC, 57SC, 61SC, 63SC, 67SC, 6SC, 59SC	XXVI	N=14 (32,6%)
5SC2, 5SC1, 6SC3, 27SC, 43SC, 48SC, 63SC1, , 54SC1,	XX	N=8 (18,6%)
11SC1, 30SC1, 36SC, 40SC, 41SC1, 49SC, 73SC	XXXVI	N=7 (16,3%)
8SC	VIII	N=1 (2,3%)
6SC1	XXIV	N=1 (2,3%)
11SC2	XXV	N=1 (2,3%)
25SC1	XXVII	N=1 (2,3%)
23SC1	XXVIII	N=1 (2,3%)
6SC2	XXIX	N=1 (2,3%)
30SC2	XXX	N=1 (2,3%)
30SC	XXXI	N=1 (2,3%)
26SC2	XXXII	N=1 (2,3%)
34SC	XXXIII	N=1 (2,3%)
16SC	XXXIV	N=1 (2,3%)
15SC	XXXV	N=1 (2,3%)
23SC2	XXXVII	N=1 (2,3%)
18SC	XXXVIII	N=1 (2,3%)

*La designación de la cepa se hizo de acuerdo al número dado al paciente.

**El biotipo se asignó de acuerdo al comportamiento enzimático de la bacteria.

Diferencias intra-individuo de biotipos en niños con caries y sin caries

En niños con caries dental, las cepas aisladas de los pacientes 30 (30C y 30C1), 101 (101C1 y 101C2), 143 (143C1 y 143C2), 145 (145C y 145C1), 152 (152C1 y 152C2), 154 (154C1, 154C2 y 154C3) 161 (161C y 161C1), 163 (163C y 163C1), 171 (171C y 171C1), 175 (175C y 175C1), 183 (183C y 183C1), 190 (190C1 y 190C2), 193 (193C y 193C1), 194 (194C y 194C1), 195 (195C1 y 195 C2), 197 (197C1 y 197C2), 206 (206C y 206C1) y 209 (209C y 209C1) se agruparon en biotipos diferentes lo que permitió obtener diferencias intra-individuo (ver tabla 2).

Sin embargo, las cepas aisladas de los pacientes 147 (147C1, 147C2 y 147C3) y 217 (217C1 y 217C2) presentaron los mismos biotipos intra-individuo y en consecuencia no permitieron establecer diferencias. Por otro lado en niños sin caries dental, las cepas

aisladas de los pacientes 6 (6SC, 6SC1, 6SC2 y 6SC3), 11 (11SC1 y 11SC2), 23 (23SC1 y 23SC2), 26 (26SC1 y 26SC2), 30 (30SC, 30SC1, 30SC2), 41 (41SC y 41SC1), 48 (48SC y 48 SC1) y 54 (54SC y 54SC1) se agruparon en biotipos diferentes, señalando de igual manera diferencias de clones intra-individuo (ver tabla 3). Sin embargo, las dos cepas aisladas del paciente 5 (5SC1 y 5SC2) se tipificaron en el mismo biotipo.

Susceptibilidad antimicrobiana

En la tabla 4 se presenta la CIM₅₀, CIM₉₀ y valores promedios de la CIM para los 121 aislamientos. Todos los 121 aislamientos fueron altamente sensibles a Penicilina, Amoxicilina, Cefazolina, Eritromicina, Clindamicina, Imipenem, Vancomicina y Teicoplanina. El 50 y 90% de las cepas *S. mutans* fueron respectivamente, inhibidas, con todos los antibióticos, por concentraciones menores a 0,12 y 1,0 µg/ml. Los valores promedios más bajos de CIMs se obtuvieron para la penicilina, eritromicina e imipenem. En general no se presentaron diferencias estadísticamente significativas entre los biotipos en cuanto a susceptibilidad antimicrobiana.

Tabla 4. Susceptibilidad antimicrobiana (µg/ml) in vitro de 121 aislamientos clínicos de *S. mutans* a 8 agentes antimicrobianos

Antibióticos	Rango	Media	CIM50	CIM90
Penicilina	0,015-0,03	0,020	0,030	0,030
Amoxicilina	0,015-0,25	0,11	0,12	0,25
Cefazolina	0,03-1,0	0,15	0,12	0,25
Eritromicina	0,007-0,25	0,15	0,12	0,25
Clindamicina	0,015-0,25	0,16	0,12	0,25
Imipenem	0,007-0,25	0,10	0,12	0,25
Vancomicina	0,015-1,0	0,24	0,25	1,0
Teicoplanina	0,12-1,0	0,35	0,25	1,0

DISCUSIÓN

El establecimiento y posterior multiplicación de *S. mutans* en la cavidad oral está influenciado por varios factores [5]. La capacidad metabólica de este microorganismo para sintetizar glucanos insolubles a partir de la sacarosa presente en la dieta, y producir ácidos que descienden el pH y conducen a la desmineralización del diente, tiene gran importancia en el proceso de iniciación y desarrollo de la caries dental [5]. El claro reconocimiento de este microorganismo como la principal especie bacteriana implicada

en la caries dental, ha conducido a la implementación de medidas de prevención y control dirigidas hacia la eliminación o disminución de este en la cavidad oral [8].

En diferentes investigaciones se ha mostrado la relación directa que existe, entre la cantidad de *S. mutans* en cavidad oral con la incidencia y prevalencia de la caries dental [1, 4, 17]. En el presente estudio, además de que la frecuencia de *S. mutans* en los niños con caries dental fue superior a la presentada en niños sin caries dental (44,1% vs 38%), se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) en el recuento en las dos poblaciones, que señalan la alta tasa de colonización con *S. mutans* que tienen los niños con caries dental.

En el presente estudio no se pudo tener acceso a información sobre los diferentes hábitos de higiene que llevaban a cabo los niños incluidos en el estudio. Existió mucha dificultad para recoger esta información que por otro lado puede ser muy variable e impedir hacer una correlación correcta con los biotipos encontrados en los dos grupos clínicos. La indicación de no cepillarse los dientes y evitar la ingesta de alimentos antes de la toma de muestra, tuvo como fin normalizar todas las muestras y recuperar *S. mutans* en un momento muy oportuno sin alteraciones.

De acuerdo a lo que manifiesta Krzysciak y colaboradores [18] muy seguramente tener información y control de los hábitos higiénicos que llevan los niños, permitirá entender mejor el papel de los biotipos de *S. mutans* y su relación en la patogenicidad en niños con y sin caries dental.

La prueba api-ZYM (bioMérieux Marcy-létoile, France) no es la prueba de “oro” para la caracterización biotípica de *S. mutans*. Existe otra prueba, Sistema STREPTOtest (Lachema, Pliva) [18] que también se ha utilizado con este fin. La idea de utilizar estos sistemas es poder determinar algunas diferencias que presenta esta bacteria en su sistema enzimático. El sistema api-ZYM [9-10, 19-20] ha permitido obtener diferencias en el perfil enzimático que conduce a obtener diferentes biotipos que se pueden relacionar con presencia o ausencia de caries.

En cuanto a sensibilidad esta prueba requiere de una concentración bacteriana > 10.000 UFC/ml, por lo cual es necesario tener esta bacteria aislada en forma abundante en agar sangre o agar BHI. En cuanto a especificidad, para caracterizar esta bacteria por el sistema api-ZYM, es necesario que la bacteria *S. mutans* esté previa y correctamente identificada por pruebas bioquímicas o moleculares. Si no se tiene esta claridad, otras bacterias podrían tener un perfil biotípico muy parecido a *S. mutans* que conduciría a interpretaciones erróneas [9-10]. Es muy importante resaltar en este estudio que el mayor número de reacciones enzimáticas positivas dadas en el sistema Api-Zym se presentaron en un pH ácido ($pH = 5,4$), situación que puede estar relacionada con algunas

de las características específicas de *S. mutans*, capacidad de producir constantemente ácidos en un pH bajo o ácido (acidogenicidad) y de tolerar y sobrevivir en medios ácidos (aciduricidad) [1].

En niños menores de 6 años se han identificados los siguientes factores que predisponen el desarrollo de caries dental en la infancia temprana: un alto número de *S. mutans*, presencia de placa dental, inadecuadas prácticas de alimentación, bajo estatus socioeconómico y cultural, bajo nivel de educación de los padres y no disponibilidad de los servicios de salud [21]. La muestra del presente estudio estuvo conformada por 206 niños con edades entre 3 y 5 años de los estratos socioeconómicos 2 y 3.

En los niños, el estrato socioeconómico 3 prevaleció en un 58%, el grado de escolaridad de secundaria incompleta en el padre fue de 46% y la unión libre se presentó en un 52%. Por otro lado en un 55% los ingresos familiares fueron de hasta un salario mínimo y el 70% de las familias estaban afiliadas al sistema de salud. Estos resultados contrastan con los informados por Díaz y colaboradores [22] en un estudio realizado en niños escolares en Cartagena, en el que se reportó la prevalencia del estrato socioeconómico 2 con un 47%, el grado de escolaridad de secundaria incompleta en el padre de 38%, la presencia de unión libre en un 46%, ingresos familiares en un 47% de hasta un salario mínimo y afiliación de las familias al sistema de salud en un 66%.

En el estudio de Gómez-Osorno y colaboradores [23] realizado en una población entre 3 a 5 años en una institución educativa de Medellín, se evidenciaron de igual manera situaciones sociodemográficas, económicas y culturales de inequidad que conducen al desarrollo de caries dental.

Por otro lado en el presente estudio prevalecieron las lesiones cariosas no cavitadas y no se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$) entre los estados de caries dental y la presencia de biotipos de *S. mutans*, es decir los biotipos más frecuentes de *S. mutans* en niños con caries dental (XV, XI, XII, XIV, XVII y XVIII) se distribuyeron de igual manera entre los niños con lesiones no cavitadas y con índices de caries muy similares.

En este estudio sobresale el alto número de biotipos obtenidos: 24 en el grupo de caries y 14 en el grupo sin caries. Estos perfiles biotípicos, que indican una variada actividad enzimática de *S. mutans*, permitieron establecer diferencias inter e intra-individuo (ver tablas 2 y 3). En niños sin caries, las cepas aisladas de los pacientes 6, 11, 23, 26, 30, 41, 48 y 54 al ubicarse en diferentes grupos permitieron establecer diferencias intra-individuo. Sin embargo, las dos cepas del paciente 5 se agruparon en el mismo biotipo y no lograron determinar diferencias intra-individuo.

En niños con caries, las cepas aisladas de los pacientes 30, 101, 143, 145, 152, 154, 161, 163, 171, 175, 183, 190, 193, 194, 195, 197, 206 y 209 se tipificaron en diferentes grupos lo que en consecuencia permitió establecer diferencias intra-individuo. Sin embargo, las cepas aisladas de los pacientes 147 y 217 se agruparon en los mismos biotipos y no permitieron obtener diferencias intra-individuo. Estos hallazgos señalan la capacidad discriminatoria del método de tipificación, que puede ser de gran valor en estudios epidemiológicos de transmisión intra-familiar y en estrategias de prevención [24].

En otros estudios se han utilizado diferentes métodos de tipificación para demostrar la heterogeneidad y variabilidad genética de cepas *S. mutans* presentes en la cavidad oral [5, 10, 25-31]. Está claramente establecido que se encuentran diferentes tipos de *S. mutans* en niños con caries dental con relación a los niños sin caries [25, 26, 32-34].

En este estudio llama la atención la diferencia encontrada en los biotipos más frecuentes en los niños con y sin caries dental. En el grupo de caries los biotipos más frecuentes fueron el XV, XI y XII, respectivamente, con 26, 12 y 11 cepas y en el grupo sin caries los biotipos más frecuentes fueron el XXVI, XX y XXXVI, respectivamente, con 14, 8 y 7 cepas. Muy seguramente la presencia de perfiles únicos encontrados en los niños con caries dental respecto a los niños sin caries dental pueda sugerir una mayor capacidad de virulencia de las cepas *S. mutans*. En este sentido en el estudio de Napigoma y colaboradores [34] se evaluó la relación entre la diversidad clonal y algunos factores de virulencia de *S. mutans* aislados de individuos con caries y sin caries dental; los resultados mostraron 44 diferentes perfiles, con un número máximo de 8 perfiles en un individuo.

También hallaron un gran número de genotipos de *S. mutans* con mayor habilidad para sintetizar glucanos insolubles, uno de los puntos importantes de contribución para la génesis y desarrollo de la caries dental. Por otro lado en el estudio de Krzysciak y colaboradores [18] se habla de la utilidad de la biotipificación en el reconocimiento de determinantes patogénicos en *S. mutans*. También demostraron que la enzima deshidrogenasa pefenato del Biotipo I (tipificado con el sistema STREPTOtest) presente en la mayoría de cepas *S. mutans* de niños con caries dental tenía mayor actividad que la presentada en *S. mutans* aislados de niños sin caries dental. Por todo lo anterior y por la utilidad de la biotipificación en la discriminación de cepas *S. mutans* en niños con y sin caries dental, se deben continuar las investigaciones para demostrar las implicaciones y relaciones de los biotipos con la patogenicidad de *S. mutans* y su papel en la génesis y desarrollo de la caries dental.

La bacteriemia originada desde cavidad oral es común y en algunas ocasiones produce endocarditis. *S. mutans*, por su alta frecuencia en niños con y sin caries dental y como resultado de tratamientos dentales puede producir bacteriemia, infecciones sistémicas y endocarditis subaguda [35]. El adecuado tratamiento de estas infecciones hace necesario conocer la susceptibilidad antimicrobiana de las cepas de *S. mutans* aisladas de cavidad oral. Las 121 cepas de *S. mutans* aisladas en este estudio, sin encontrarse diferencias estadísticamente significativas entre los dos grupos de pacientes, mostraron alta sensibilidad a los antimicrobianos evaluados, no presentaron resistencia antimicrobiana y los patrones obtenidos están muy de acuerdo con los observados por otros autores [9, 15-16, 36].

Aunque el tratamiento de caries dental no se hace con antimicrobianos, ya que pueden llevar a la destrucción inespecífica de muchos microorganismos de la cavidad oral que conduce a una reinfección con *S. mutans* con posibilidad de regresar a los niveles de pretratamiento, es importante dejar claro que las cepas *S. mutans* de origen colombiano aisladas en este estudio siguen siendo sensibles y que en el caso de presentarse infecciones sistémicas o endocarditis producidas por *S. mutans* se dispone de un buen número de antimicrobianos que van a tener alta efectividad sobre este microorganismo.

En conclusión, se encontró lo siguiente: a) en la población de estudio se encontró una gran diversidad biotípica, b) los aislamientos fueron altamente susceptibles a los antimicrobianos evaluados, y c) en cada grupo de pacientes se identificaron biotipos particulares que podrían indicar una colonización específica.

AGRADECIMIENTOS

Este estudio fue financiado por Vicerrectoría de Investigación de la Pontificia Universidad Javeriana dentro del proyecto “Identificación del microcosmos bacteriano ligado a placa dental en niños con y sin caries dental: seguimiento a 3 y 6 meses después de un proceso de educación” con número de proyecto 5499.

CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

REFERENCIAS

1. W. Loesche, Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay, *Microbiol. Rev.*, **50**, 353 (1986).
2. F.H.M. Mikx, J.S. van der Hoeven, K.G. Konig, A.J.M. Plasschaert, B. Guggenheim, Establishment of defined microbial ecosystems in germ-free rats I: The effect of the interaction of *Streptococcus mutans* or *Streptococcus sanguis* with *Veillonella alcalescens* on plaque formation and caries activity, *Caries Res.*, **6**, 211 (1972).
3. D. Bighton, F. Manji, V. Baelum, O. Fejerskov, N.W. Johnson, J.M. Wilton, Associations between salivary levels of *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus*, lactobacilli, and caries experience in Kenyan adolescents, *J. Dent. Res.*, **68**, 1242 (1989).
4. N. Lang, P.R. Hotz, F.A. Gusberti, A. Joss, Longitudinal clinical and microbiological study on the relationship between infection with *Streptococcus mutans* and the development of caries in human, *Oral Microbiol. Immunol.*, **2**, 39 (1987).
5. S. Hamada, H.D. Slade, Biology, immunology and cariogenicity of *Streptococcus mutans*, *Microbiol. Rev.*, **44**, 331 (1980).
6. A.L. Coykendall, K.B. Gustafson, Taxonomy of *Streptococcus mutans*, En: "Molecular microbiology and immunobiology of *Streptococcus mutans*", S. Hamada, S.M. Michalek, H. Kiyono, L. Menaker, J.R. McGhee eds., Elsevier Science, Amsterdam, 1986.
7. K.H. Schleifer, R. Kilpper-Bälz, Molecular and chemotaxonomic approaches to the classification of streptococci, enterococci, and lactococci: a review, *System Appl. Microbiol.*, **10**, 1 (1987).
8. F. Gamboa, B. Herazo, M.C. Martínez, Control microbiológico sobre *Streptococcus mutans* y su acción acidogénica, *Univers. Scient.*, **9**, 45 (2004).
9. A. de La Higuera, J. Gutiérrez, J. Liébana, A. García-Mendoza, A. Castillo, A new biotyping method for *Streptococcus mutans* with the api-ZYM system, *Clin. Microbiol. Infect.*, **5**, 88 (1999).
10. F. Gamboa, M. Chaves, M. Estupiñan, A. Galindo, Bacteriocins in *S. mutans* strains isolated from children with and without dental caries: biotypes and sensitivity to antibiotics, *Acta Odontol. Latinoam.*, **1**, 103 (2008).

11. World Health Organization, Individual tooth status and treatment need, En: "Oral Health Surveys: Basic Methods", 3rd ed., World Health Organization, Geneva, Switzerland, 1987.
12. S. Fure, Five year incidence of caries, salivary and microbial conditions in 60-, 70- and 80-year-old swedish individuals, *Caries Res*, **32**, 166 (1988).
13. C.G. Emilson, Prevalence of *Streptococcus mutans* with different colonial morphologies in human plaque and saliva, *Scand. J. Dent. Res.*, **91**, 26 (1981).
14. F. Gamboa, M. Chaves, C. Lamby, A. Fajardo, A. Arevalo, Antagonistic action of indigenous *Streptococcus mutans* strains, *Acta Odontol. Latinoam.*, **22**, 129 (2009).
15. J. Liebana, A. Castillo, J. Peis, P. Baca, G. Piedrola, Antimicrobial susceptibility of 1042 strains of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus*: Comparison from 1985 to 1989, *Oral Microbiol. Immunol.*, **6**, 146 (1991).
16. A. De la Higuera, A. Castillo, J. Gutiérrez, A. García-Mendoza, J. Liébana, In vitro susceptibility, tolerance and glycoalex production in *Streptococcus mutans*, *J. Antimicrob. Chemother.*, **40**, 359 (1997).
17. R.U. Kamiya, M.H. Napimoga, R.T. Rosa, J.F. Höfling, R.B. Goncalves, Mutacin production in *Streptococcus mutans* genotypes isolated from caries-affected and caries-free individuals, *Oral Microbiol. Immunol.*, **20**, 20 (2005).
18. W. Krzysciak, K. Pluskwa, J. Piatkowski, P. Krzysciak, A. Jurczak, D. Koscielniak, A. Skalniak, The usefulness of biotyping in the determination of selected pathogenicity determinants in *Streptococcus mutans*, *BMC Microbiology*, **14**, 194 (2014).
19. M.W. Humble, A. King, I. Phillips, API-ZYM: A simple rapid system for the detection of bacterial enzymes, *J. Clin. Pathol.*, **30**, 275 (1977).
20. S. Waitkins, L. Ball, C. Fraser, Use of the API-ZYM system in rapid identification of alfa and non-haemolytic streptococci, *J. Clin. Pathol.*, **33**, 53 (1980).
21. T. Parisotto, C. Steiner-Olivera, C. Duque, R. Rocha, L. Azevedo, M. Nobredos-Santos, Relationship among microbiological composition and presence of dental plaque, sugar exposure, social factors and different stages of early childhood caries, *Arch. Oral Biol.*, **55**, 365 (2010).
22. S. Díaz-Cárdenas, F. González-Martínez, Prevalencia de caries dental y factores familiares en niños escolares de Cartagena de Indias, Colombia, *Rev. Salud Pública*, **33**, 843 (2010).

23. A. Gómez-Osorno, T. Bernal-Álvarez, A. Posada-López, A. Agudelo-Suárez, Caries dental, higiene bucal y necesidades de tratamiento en población de 3 a 5 años de una institución educativa de Medellín y sus factores relacionados, *Rev. Nacional Odontol.*, **11**, 23 (2015).
24. D.M. Palomari, J.F. Höfling, A.C. Pizzolitto, E.A. Rosa, T.C. Negrini, L.C. Spolidorio, Genetic polymorphism of *Streptococcus mutans* in Brazilian family members, *Braz. J. Microbiol.*, **34**, 213 (2003).
25. L. Grönroos, S. Alaluusua, Site-specific oral colonization of mutans streptococci detected by arbitrarily primed PCR-Fingerprinting, *Caries Res.*, **34**, 474 (2000).
26. Y. Li, P.W. Caufield, E.I. Redmo, E. Thornqvist, Differentiation of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* via genotypic and phenotypic profiles from three different populations, *Oral Microbiol Immunol.*, **16**, 16 (2001).
27. J. Kelstrup, S. Richmond, C. West, R.J. Gibbons, Fingerprinting human oral streptococci by bacteriocin production and sensitivity, *Arch. Oral Biol.*, **15**, 1109 (1970).
28. C. van Loveren, J.F. Buijs, J.M. Ten Cate, Similarity of bacteriocin activity profiles of mutans streptococci within the family when the children acquire the strains after the age of 5, *Caries Res.*, **34**, 481 (2000).
29. Emanuelsson I.M., Carlsson P., Hamberg K., Bratthall D., Tracing genotypes of mutans streptococci on tooth sites by random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis. *Oral Microbiol Immunol*, **18**, 24 (2003).
30. N. Damé-Teixeira, R. Alex, C. Fatturi, M. Maltz, Genotypic diversity and virulence traits of *Streptococcus mutans* isolated from carious dentin after partial caries removal and sealing, *The Scientific World Journal*, **2014**, Article ID 165201, 6 pages (2014), doi: <http://dx.doi.org/10.1155/2014/165201>
31. D. Lynch, A. Villhauer, J. Warren, T. Marshall, D. Dawson, D. Blanchette, K. Phipps, D. Starr, D. Drake, Genotypic characterization of initial acquisition of *Streptococcus mutans* in American Indian children, *J. Oral. Microbiol.*, **7**, 10.3402/jom.v7.27182 (2015), doi: <http://dx.doi.org/10.3402/jom.v7.27182>
32. D. Cogulu, E. Sabah, A. Uzel, F. Ozkinay, Genotyping of *Streptococcus mutans* by using arbitrarily primed polymerase chain reaction in children with Down Syndrome, *Arch. Oral Biol.*, **51**, 177 (2006).
33. C.P. Tabchoury, M.C. Sousa, R.A. Arthur, R.O. Mattos-Graner, A.A. Del Bel Cury, J.A. Cury, Evaluation of genotypic diversity of *Streptococcus mutans* using distinct arbitrary primers, *J. Appl. Oral. Sci.*, **16**, 403 (2008).

34. M.H. Napigoma, R.U. Kamiya, R. Takaki, E.V. Rosa, J.F. Hófling, R.O. Mattos-Graner, R.B. Gonçalves, Genotypic diversity and virulence traits of *Streptococcus mutans* in caries -free and caries-active individuals, *J. Med. Microbiol.*, **53**, 697 (2004).
35. R.F. Ullman, S.J. Miller, M.J. Strampfer, B.A. Cunha, *Streptococcus mutans* endocarditis: report of three cases and review of the literature, *Heart Lung*, **17**, 209 (1988).
36. G. Pasquantonio, S. Condó, L. Cerroni, L. Bikiqu, M. Nicoletti, M. Prenna, S. Ripa, Antibacterial activity of various antibiotics against oral streptococci isolated in the oral cavity, *Int. J. Immunopathol. Pharmacol.*, **3**, 805 (2012).

CÓMO CITAR ESTE ARTÍCULO

F. Gamboa, D.A. García, C.P. Lamby, A.L. Sarralde, Biotipos y susceptibilidad antimicrobiana de *S. mutans* en niños con y sin caries dental, *Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm.*, **45**(2), 288-304 (2016).

Cosmetovigilancia: un estudio de alcance

Paola Natalia Cáceres Guevara¹, Karen Luise Lang², Marcela Aragón Novoa^{1*}

¹Departamento de Farmacia, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, Sede Bogotá, Cra. 30 N. ° 45-03, Bogotá D.C., Colombia.

*Correo electrónico: dmaraconn@unal.edu.co

²Departamento de Farmácia, Universidade Federal de Juiz de Fora, Campus Avançado de Governador Valadares, Governador Valadares/MG, Brasil.

Recibido para evaluación: 7 de marzo de 2016

Aceptado para publicación: 21 de julio de 2016

RESUMEN

Los cosméticos son productos de venta libre y de uso diario para los consumidores, quienes restan importancia a las implicaciones de salud que pueden experimentar a causa de los mismos. Es necesario monitorear la postcomercialización de estos productos, ya que en los años recientes se han visto asociados a reacciones adversas; de esta manera nace el concepto de cosmetovigilancia y la necesidad de implementar sistemas para llevarla a cabo. Esta revisión sistemática encontró un limitado número de publicaciones que informen del estado actual y de las tendencias de la cosmetovigilancia, aunque fue posible definir el concepto e identificar los países que lo han desarrollado e implementado, siendo la Unión Europea quien lidera estos aspectos, contando con la participación de distribuidores, industrias, profesionales de la salud y consumidores. La cosmetovigilancia es un campo de la vigilancia sanitaria que se encuentra aún en desarrollo y por lo tanto, es importante continuar con la indagación al respecto, hasta lograr un mecanismo de vigilancia eficiente y útil tanto para los países miembros de la Unión Europea, como para aquellos que aún se encuentran en vías de desarrollo, como Colombia.

Palabras claves: Cosmetovigilancia, legislación de cosméticos, seguridad de cosméticos, sistema de notificación.

SUMMARY

Cosmetovigilance: a scoping study

Cosmetics are free sale products that are used daily by consumers who usually not concerned about the possible health implications by the use of these products. It is necessary to perform a post-sale monitoring for these products, since in recent years they have been associated with adverse reactions. For this reason was built the cosmetovigilance concept as well as the need to implement a system to perform this task. This systematic review found a limited number of publications about the current cosmetovigilance status and tendencies at world level. Nevertheless, it was possible to define the concept and identify the countries that have developed and implemented this system. European Union is the leader in this topic, with investigations, regulations, development and implementation of an harmonized cosmetovigilance system. These activities include the participation of distributors, manufacturing industries, health professionals and consumers. Cosmetovigilance is a sanitary vigilance area that is still under development and therefore it is important to keep on investigating about this topic until achieve an efficient and useful system, for both European Union members and developing countries such as Colombia.

Keywords: cosmetovigilance, legislation cosmetics, safety cosmetics, notification system.

INTRODUCCIÓN

Los productos cosméticos han sido utilizados por el ser humano desde hace muchos años, convirtiéndose en una necesidad para su desarrollo social y cultural puesto que condiciona su imagen ante la sociedad proporcionando características de belleza, higiene, protección y limpieza. Dentro de los productos que hacen parte de la rutina diaria de los individuos, se encuentran por ejemplo, cremas para la piel, jabones, desodorantes, etc., que inicialmente fueron elaborados a base de plantas y minerales, pero el avance de la tecnología ha contribuido a incorporar en la formulación de estos productos ingredientes de origen sintético. Actualmente, se ha encontrado un aumento significativo en la población que utiliza productos cosméticos para diferentes propósitos, especialmente aquellos relacionados con la higiene personal [1].

Es por esto que la industria cosmética es una de las que posee mayor demanda en ventas ya que personas de todas las edades, razas, géneros y clases social hacen uso de sus productos,

por lo que es importante hacer seguimiento a la seguridad en su uso, ya que el enfoque global de control está sobre la calidad del producto y no sobre el uso que se les llega a dar.

La vigilancia y control de productos cosméticos ha sido ampliamente divulgada en muchos países, de acuerdo con normas para la producción o fabricación, venta, almacenamiento, etiquetado, envasado y registros sanitarios. Para estos existen por ejemplo, las BPMC (Buenas Prácticas de Manufactura de Cosméticos), que brindan directrices para garantizar la calidad en su producción. Hasta ahora, el número de reacciones adversas conocidas con relación a los cosméticos es muy bajo, probablemente a causa de la imposibilidad para hacer un diagnóstico debido a factores como la no consulta médica, la práctica difundida de la automedicación o incluso la subestimación de dichas reacciones adversas por parte de los profesionales de la salud [2-10].

Teniendo en cuenta que los productos cosméticos son de uso frecuente, tienen carácter de venta libre y su publicidad se da libremente en medios de comunicación, es necesario ampliar la información acerca de posibles reacciones adversas que se pueden presentar asociadas a su uso. En especial porque cada vez son mayores los relatos relacionados con la aparición de efectos no deseados asociados al uso de productos cosméticos a pesar de haber sido fabricados con altos estándares de calidad [11-14]. Por esta razón, este estudio tiene como objetivo determinar cómo se encuentra el avance de la reglamentación y cuáles son las tendencias de la cosmetovigilancia a nivel mundial.

METODOLOGÍA

Para responder al objetivo del estudio se llevó a cabo una revisión sistemática de toda literatura existente hasta el mes septiembre del 2015. Para esto se elaboró un listado de palabras o asociación de palabras relacionadas, teniendo en cuenta variaciones de idioma y sinónimos. Se utilizaron términos Mesh (*medical subject headings*, National Library of Medicine's USA), y operadores booleanos específicos a cada base de datos consultada. Con el listado establecido se agregó el banco de términos en idioma inglés, español, francés y portugués, de tal manera que las palabras clave fueron: cosmetovigilancia, ley, normativa, legislación, regulación, revisión, guía, manual, decreto, resolución, control y combinaciones de las mismas, en estos cuatro idiomas. Para la búsqueda, se consultaron bases de datos como *Google*, *ScienceDirect*, *PubMed*, *Google Scholar*, *Medline*, *Embase*, metabuscador SINAB.

Se realizaron búsquedas individuales para cada una de las palabras clave y asociaciones de palabras clave, con ayuda del formato de la herramienta PICO (P: población, I: intervención, C: comparación, O: desenlace), para lo cual se tuvieron en cuenta los siguientes criterios de inclusión: artículos científicos, normativas y reglamentaciones,

manuales y guías basados en normatividad (resolución, decreto, ley, reglamento), tesis, trabajos de grado, notas informativas y documentos en idioma: inglés, español, francés o portugués. Se excluyeron documentos en forma de presentación (ppt), folletos, notas informativas que no sean publicadas por una agencia regulatoria, noticias y artículos científicos que no se encontrarán en revistas indexadas.

Para la selección de la literatura se consideró el título de cada documento, al leerlo se detalló su relación con el objetivo del estudio, si el título estaba relacionado, se continuó leyendo el resumen, si estaba relacionado se leyó en su totalidad el documento. Si cada una de estas etapas fue aprobada, se estableció que si era pertinente su uso para desarrollar el estudio.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para llevar a cabo el estudio se seleccionaron 83 documentos, todos ellos con información acerca de la cosmetovigilancia en el mundo. La clasificación de esa documentación dependió de la información que brindaba. La mayor cantidad de publicaciones (43%) realizadas alusivas a cosmetovigilancia se encontraron en forma de artículos científicos. Por otra parte, se hallaron publicaciones con base a normatividad a nivel mundial (29%); guías o manuales sobre cosmetovigilancia (8%), fichas de notificación de efectos no deseados (7%), trabajos de grado (8%) y otros (5%).

Uno de los aspectos revisados en las 83 publicaciones fue la identificación de las definiciones de “cosmético”, “cosmetovigilancia”, “efecto no deseado” y “efecto grave no deseado” y sus variaciones según cada país y su reglamentación. Cada país cuenta con definiciones e interpretaciones referentes a los productos cosméticos en sus respectivas normativas. En este caso se encontraron las establecidas según la Unión Europea, Estados Unidos de América, Mercosur y CAN (Comunidad Andina de Naciones) de la cual hace parte Colombia.

Definiciones

Definición de cosmético

En la tabla 1 se presentan las definiciones de cosmético según la normatividad vigente en diferentes países. Esto con el fin de determinar las diferencias que existen entre las mismas, a nivel de composición, función que cumple y vía de administración. Para esto, se realizó la comparación entre las establecidas en la Unión Europea, Mercosur, Estados Unidos de América y CAN.

De las anteriores definiciones se puede resaltar que no se encuentran las palabras sanar, tratar, curar o prevenir ningún tipo de enfermedad y por lo cual no se les puede atribuir ningún efecto terapéutico. En cuanto a la vía de administración, se infiere que los productos destinados a ser ingeridos, inyectados o implantados en el cuerpo humano no entran en la definición de cosmética al igual que los productos que contengan ingredientes que ejerzan una acción farmacológica, inmunológica o metabólica [8].

En cada una de las definiciones presentadas en la tabla 1 se encuentra establecido puntualmente cuál es la función de los cosméticos, siendo la Unión Europea quien hace mayor énfasis en cada posible uso: “limpiar, perfumar, modificar aspecto, proteger, mantener en buen estado o corregir los olores corporales” [15-18]. A pesar de que en Mercosur y en la CAN se establece prácticamente la misma definición, es en Europa donde se da originalmente a través de la Directiva de Productos Cosméticos (76/768/EEC) en 1976 [1, 3, 4, 9].

Según el Reglamento (CE) N.º 1223/2009 del Parlamento Europeo y del Consejo, para clasificar un producto como cosmético, el producto debe cumplir con la definición de acuerdo con la función, la presentación, modo de aplicación y la composición. Con la excepción de la composición, los demás criterios son evaluados de acuerdo con las afirmaciones hechas en la etiqueta. Para ser un cosmético, el fabricante no puede referirse a tratar, prevenir o aliviar una enfermedad. Un producto que se desvía de la definición para cualquiera de estos criterios puede ser considerado “cosmético no compatible” y puede ser asignado a otra categoría (por ejemplo, dispositivos médicos, aromatizantes o producto de consumo general) cubierto por otros tipos de reglamentos. Los productos que no se ajusten a una categoría alternativa se convierten en “no clasificado” o “productos fronterizos” [3, 10, 19]. Es importante enfatizar que para todas las propuestas de definición de cosmético, se indica qué tipo de productos deben ser de uso seguro [7, 20-22].

La definición de cosmético y también la importancia de su seguridad, en el caso de la Unión Europea, se establece de acuerdo con la Directiva de Productos Cosméticos (76/768/EEC) que se ha modificado ya que se han adicionado conceptos complementarios importantes, por ejemplo, la seguridad del uso y la influencia sobre los consumidores (efectos no deseados), las condiciones de fabricación y la persona responsable; esto con el fin de enfatizar en la importancia de la regulación de la industria cosmética. Esta directiva (76/768/EEC) fue reemplazada por el Reglamento N.º 1223/2009 desde julio del 2013 [7, 20-22].

Tabla 1. Definiciones establecidas para el término “Cosmético” según la Unión Europea, Mercosur, Estados Unidos de América y Colombia (CAN)

COSMÉTICO	
Unión Europea	Toda sustancia o mezcla destinada a ser puesta en contacto con las partes superficiales del cuerpo humano (epidermis, sistema piloso y capilar, uñas, labios y órganos genitales externos) o con los dientes y las mucosas bucales, con el fin exclusivo o principal de limpiarlos, perfumarlos, modificar su aspecto, protegerlos, mantenerlos en buen estado o corregir los olores corporales [15].
Estados Unidos	Artículo pensado para ser frotado, para corregir, rociar, introducir o aplicar de otra manera en el cuerpo o cualquier parte para limpiar, embellecer, promover el atractivo o alterar la apariencia, y el artículo destinado a ser utilizado como un componente de cualquiera de estos artículos, excepto que dicho término no incluya jabón [16].
Mercosur	Preparaciones constituidas de sustancias naturales o sintéticas, de uso externo en diversas partes del cuerpo humano, piel, sistema capilar, uñas, labios, órganos genitales externos, dientes y membranas de la cavidad oral, con el objetivo exclusivo o principal de limpiarlos, perfumarlos, alterar su apariencia y/o corregir los olores corporales y/o protegerlos o mantenerlos en buen estado [17].
Colombia/ CAN	Toda sustancia o mezcla destinada a ser puesta en contacto con las partes superficiales del cuerpo humano (epidermis, sistema piloso y capilar, uñas, labios y órganos genitales externos) o con los dientes y las mucosas bucales, con el fin exclusivo o principal de limpiarlos, perfumarlos, modificar su aspecto, protegerlos, mantenerlos en buen estado o corregir los olores corporales [18].

También es importante mencionar que ciertos productos considerados en la Unión Europea como cosméticos han sido clasificados en Estados Unidos, a través de la Food and Drug Administration (FDA), como medicamentos de venta sin receta médica (OTC, Over The Counter), que “son medicamentos comercializados para su uso por el consumidor sin la intervención de un profesional de la salud con el fin de obtener el producto” [9]. Un producto se considera un cosmético u OTC en función de su uso previsto y se basa en la percepción del consumidor. Ejemplos de OTC son tratamientos tópicos para el acné, anticaries y pastas de dientes antiplaca, productos anticaspa, anti-transpirantes, aclaradores de la piel, productos para la protección de la piel agrietada o las membranas mucosas, los filtros solares (incluyendo todos los productos que aseguran un factor de protección solar, incluso si este no es su propósito principal). Para todos estos productos, la FDA ha publicado monografías OTC, que son instrumentos de regulación para cada categoría específica de productos de venta sin receta médica [4, 9, 23].

Definición de cosmetovigilancia

La definición de cosmetovigilancia solamente se encontró establecida en la Unión Europea, como “la actividad de salud pública destinada a la identificación, cuantificación, evaluación y prevención de los riesgos asociados a los productos cosméticos, permitiendo el seguimiento de los posibles efectos no deseados de los cosméticos, evitando su repetición o reducir sus consecuencias”. Esto es según las directrices para la comunicación de efectos graves no deseados (SUE Reporting Guidelines), que fueron demarcadas por la Comisión Europea mediante la cual los estados miembros y la industria establecieron un sistema de comunicación armonizada de los efectos graves no deseados [24-26].

Debido a que los cosméticos deben ser seguros, la industria cosmética debe incluir un seguimiento posterior a la comercialización y en el 2005 la Asociación de Cosmética Europea (COLIPA) emitió los lineamientos sobre el manejo de los reportes de efectos no deseados (SUE Reporting Guidelines). Esta guía incluye una recomendación para el uso de un método de evaluación de causalidad específicamente adaptado para los cosméticos [3, 19, 24-27].

Respecto al CAN, Estados Unidos y Mercosur, en esta revisión no se encontraron documentos normativos que aportaran a una definición exacta y establecida de cosmetovigilancia.

Definición de sistema de cosmetovigilancia

Sistema de cosmetovigilancia fue descrito por la Mercosur en el artículo 2 de la Resolución 19/2005, como un sistema que tiene como objetivo “garantizar la seguridad y eficacia de los productos de higiene personal, cosméticos y perfumes, facilitar el reporte por parte del usuario sobre problemas de uso, defectos de calidad o efectos indeseables y asegurar el acceso del consumidor a la información” [28, 29]. Con base en esta resolución, los países miembros establecieron normatividades internas sobre cómo establecer el sistema de cosmetovigilancia. En Brasil, por ejemplo, la Resolución RDC N.º 332 de Anvisa detalla que cada empresa fabricante o importadora de Productos de Higiene Personal, Cosméticos y Perfumes, debe mantener el registro y la evaluación de los reportes realizados por los usuarios y que cuando la evaluación de dichos reportes sugiera alteraciones a la salud del usuario, la empresa debe notificarlo a Anvisa [30].

Definición de efecto no deseado y efecto grave no deseado

En la Unión Europea, el establecimiento de exigencias para la implementación de un sistema de cosmetovigilancia en el Reglamento N.º 1223/2009, dio lugar a la definición de efecto no deseado y efecto grave no deseado por el uso de productos cosméticos.

De esta manera se entiende por efecto no deseado “una reacción adversa para la salud humana atribuible a la utilización normal o razonablemente previsible de un producto cosmético”, mientras que un efecto grave no deseado es “un efecto no deseado que produce una incapacidad funcional temporal o permanente, una discapacidad, una hospitalización, anomalías congénitas, riesgo inmediato para la vida o la muerte” [20, 24, 25]. Es importante entender la diferencia, ya que son los últimos los que producen un gran impacto sobre la calidad de vida del consumidor y es de vital importancia mencionar el tipo de efecto a la hora de notificarlo al sistema de cosmetovigilancia.

En el caso de efecto grave no deseado, es necesario establecer el significado del término “grave”, el cual se utiliza para describir el resultado o la actuación de un suceso en un paciente. En consecuencia, antes de la notificación o de la transmisión de un efecto *grave* no deseado, las personas responsables, los distribuidores y las autoridades competentes deben asegurarse de que cumple este criterio [20, 24, 25, 31]. Es importante resaltar que el alcance del término “grave no deseado” sigue en discusión y que incluso ha llevado a la realización de talleres como el *Summary EC Cosmetovigilance Workshop* (Bélgica, 2012), el cual se centró en lo que puede considerarse como un efecto no deseado o como un efecto grave no deseado [32-34].

En el caso de Estados Unidos no se encontraron publicaciones que soporten la existencia de un sistema de cosmetovigilancia. Sin embargo, la FDA ha desarrollado el Programa voluntario de registro de cosméticos (VCRP), que funciona como un sistema de informes poscomercialización a disposición de los fabricantes de cosméticos, envasadores y distribuidores. Está diseñado para apoyar la aplicación de la Ley de FD&C, facilitando la información relativa a la fabricación y composición de los productos cosméticos, así como los datos relacionados con las reacciones adversas de los consumidores. Sin embargo, este programa no es de obligatorio cumplimiento y no hay un sistema de reporte o notificación de efectos graves no deseados que conecte profesionales de la salud, consumidor, industria, distribuidores y autoridades competentes.

Descripción de la documentación encontrada

Los documentos que se seleccionaron para el estudio fueron clasificados según el tipo de información que contenían como: “normatividad”, “artículo científico”, “fichas de notificación”, “guías o manuales”, “trabajos de grado” y otra categoría que incluía “varios”, en donde se encuentran por ejemplo, relatorías y simposios acerca de normatividad.

La mayor cantidad de publicaciones están en la categoría de artículos científicos, representando el 43 % de los documentos que fueron base del estudio. Esto se debe a que la cosmetovigilancia es un término relativamente nuevo y aún se encuentra en etapas de investigación, especialmente de aplicación de la normatividad. Muchos de los artículos

científicos encontrados son alusivos a la normatividad existente en Europa sobre cosméticos, desde la Directiva de Productos Cosméticos (76/768/CEE) y los principios de regulación de este tipo de industria, hasta este Reglamento N.º 1223/2009 que establece la exigencia de la implementación de un sistema de cosmetovigilancia en los países miembros.

Países con publicaciones en temas de cosmetovigilancia

En la figura 1, se muestran las publicaciones sobre temas de cosmetovigilancia clasificadas por países de origen. En este análisis se incluyó la Unión Europea el cual a pesar de no ser un país propiamente dicho, es una organización que emite publicaciones que cobijan a todos los países miembros. La Unión Europea está compuesta por 28 países y para el caso de esta revisión se puede observar que 8 de ellos (Suecia, Portugal, Italia, Irlanda, Holanda, Francia, España y Bélgica) están llevando a cabo publicaciones y adelantos sobre cosmetovigilancia [2-10, 19, 22, 27, 33, 35-46]. Parte de las publicaciones realizadas por estos países incluyen manuales o guías (8 % de las publicaciones) que proponen estrategias para la implementación del Reglamento N.º 1223/2009 de la Unión Europea [47-54].

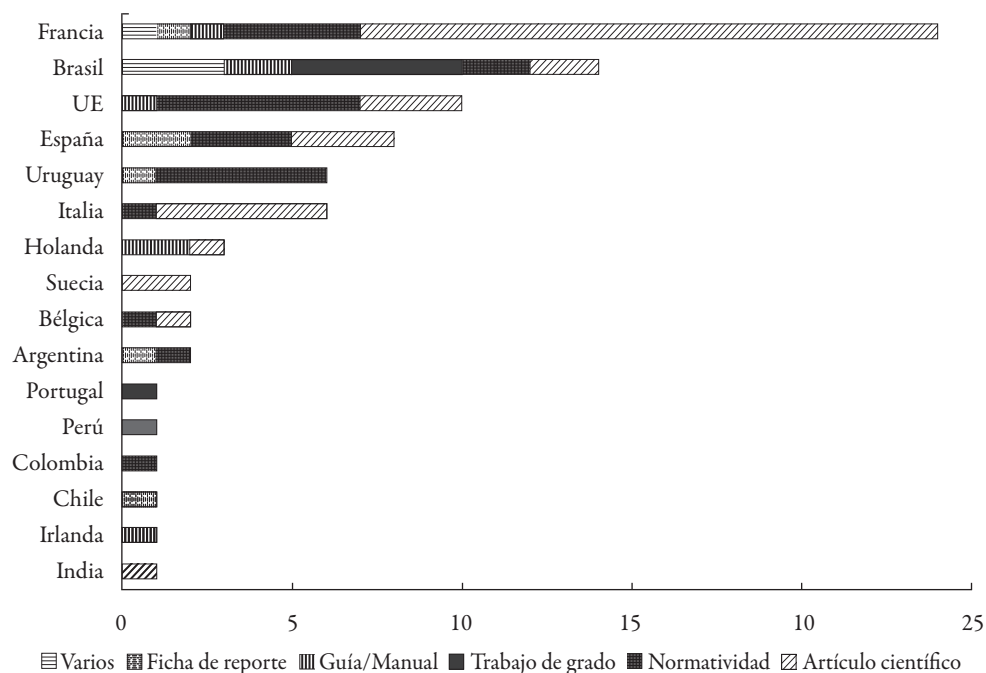


Figura 1. Países con publicaciones sobre temas de cosmetovigilancia. n = 83 publicaciones

El Comité de Expertos del Consejo de Europa sobre cosméticos (Unión Europea) ha publicado artículos científicos sobre la realización de estudios piloto de un sistema de cosmetovigilancia con el objetivo de monitorear el riesgo de ocurrencia de efectos graves no deseados atribuibles a cosméticos, incluyendo la presentación de informes y el registro sistemático de esos efectos, seguido por el análisis y la evaluación de los datos [7, 55-58]. Estos estudios demuestran que a pesar que las regulaciones afirman que los productos cosméticos deben ser seguros, estos productos pueden causar efectos graves no deseados y además, que sólo un pequeño porcentaje de los consumidores que presentan un efecto grave no deseado, informan a un profesional de la salud [32, 55, 56].

Por otra parte, la mayor parte de los artículos científicos publicados por autores italianos corresponden a la Universidad de Nápoles quienes han hecho alusión a la seguridad del uso de cosméticos para los consumidores mediante la cosmetovigilancia. Uno de estos estudios, que empleó un cuestionario suministrado por los farmacéuticos comunitarios a los clientes, mostró que el problema de la seguridad de los cosméticos es real ya que la mayoría de los consumidores suele utilizar cosméticos y un 24 % de ellos informa eventos adversos [2, 59].

Respecto a los países que componen el Mercosur (Uruguay, Brasil, Argentina y Paraguay), solamente Paraguay no presenta publicaciones en estos temas. Respecto a la CAN, constituida por Bolivia, Colombia, Ecuador y Perú, únicamente se encontraron publicaciones realizadas por Colombia y Perú [6, 9].

Realizando un análisis por países, la mayor parte de las publicaciones son realizadas por países europeos como Francia (29 %) y la Unión Europea (12 %) mientras que Brasil es el país sudamericano que presenta la mayor cantidad de publicaciones en cada una de las categorías establecidas (17 % del total).

Las publicaciones europeas partieron de la Resolución ResAp(2006) [55, 56], en la cual se establecieron las bases para un sistema de cosmetovigilancia apoyado en las notificaciones de casos. En esta resolución, el Consejo Europeo recomendó que cada uno de sus Estados miembros aplicara un sistema para registrar los efectos indeseables de los productos cosméticos con el fin de proteger la salud humana. A raíz de esta resolución fueron creados los sistemas cosmetovigilancia en Bélgica, Noruega, Suecia, Dinamarca, Alemania e Italia [55, 56, 59].

En Sudamérica se encontraron publicaciones de países como Argentina, Brasil y Uruguay, que en su mayoría aluden a la Resolución 19/2005 del Grupo de Mercado Común que reglamenta la exigencia de un sistema de cosmetovigilancia [12, 28, 29, 60-64]. De estos, el país que tiene mayor cantidad de normativas publicadas es Brasil [12, 30, 60-67] quien a través de Anvisa (Agencia Nacional de Vigilancia Sanitaria) y

por medio de la Resolución 332/2005 ha reglamentado la cosmetovigilancia en este país [31].

Anvisa presenta varios manuales en donde se explica cómo aplicar la Resolución RDC 332/2005 de Anvisa en Brasil y hace hincapié en el uso de Notivisa, un sistema de notificación de efectos no deseados que fue creado por Anvisa para facilitar el reporte de los mismos [28-30, 60-69]. Por Notivisa pueden suscribirse profesionales de la salud o instituciones/entidades mientras que los ciudadanos pueden notificar eventos adversos o quejas a través de formas técnicas de notificación [5].

En Brasil se emplea el término cosmetovigilancia con el fin de que todos los productos, con efectos adversos manifestados en la población sean rastreados y reportados a Anvisa. Entre los requisitos legales para poder llevar a cabo la comercialización de productos, el fabricante debe demostrar mediante pruebas con animales (*in vivo*) y otros físicos químicos, microbiológicos (*in vitro*) que el producto es seguro para el consumidor [30, 61, 66-68].

A nivel de Sudamérica, también se encuentran trabajos de grado que responden a la necesidad de investigación sobre la importancia de implementación de un sistema de cosmetovigilancia en países que aún no cuentan con uno y que no disponen de normatividad que exija su aplicación [1, 9, 63, 70-77].

Adicionalmente, algunas industrias productoras de cosméticos en Brasil y Francia han publicado fichas de notificación, adaptando su propio formato de reporte para los consumidores que hacen parte de sus ventas [68, 78, 79]; estos documentos se encuentran clasificados como varios.

En relación a Colombia, únicamente en el documento consolidado de preguntas y respuestas de la audiencia pública de rendición de cuentas del INVIMA realizada el 22 de noviembre de 2011, se menciona que en el año 2011 se inició una prueba piloto para el programa de cosmetovigilancia enfocada a análisis microbiológicos de cosméticos de mayor riesgo. Sin embargo, durante la presente revisión no se encontró ningún documento adicional que detalle las características o resultados de dicha prueba piloto [80].

Sistemas de notificación de reacciones adversas a cosméticos

Algunos países miembros de la Unión Europea tienen establecido un sistema de notificación voluntaria de efectos no deseados, incluso desde antes del Reglamento N.º 1223 del año 2009. Algunos de estos son Noruega, Suecia, Bélgica, Dinamarca, Alemania, Francia e Italia, donde ya se contaba con un sistema operativo de cosmetovigilancia. Por otra parte, entre los años 2012 y 2013 se llevó a cabo un proyecto piloto en Holanda, proporcionando información preliminar acerca de la cosmetovigilancia en este país.

Sin embargo, la cosmetovigilancia en estos países era variable de acuerdo con el método de registro (voluntaria o requisito legal), el tipo de participantes (dermatólogos, farmacéuticos, odontólogos y consumidores) y los organismos responsables del sistema de cosmetovigilancia (agencias gubernamentales de salud pública, y la organización de consumidores o industrias) [14, 49, 50, 57, 61, 81-84].

Debido a que la mayor cantidad de efectos graves no deseados por el uso de cosméticos, son de tipo dermatológico; son los profesionales en temas de dermatología y alergología los primeros en observar y diagnosticar con precisión los casos de alergia. La vigilancia de estos efectos adversos se garantiza por varias redes profesionales, con un propósito médico: la mejora de la gestión de los pacientes en el tratamiento de dichos efectos, mediante el aumento de velocidad en el movimiento de la información de profesional a profesional, que supera la lentitud que proporcionan las publicaciones [35-36, 55].

Con base en esto, en Francia se creó una red de vigilancia en dermatología desde 1996, llamada Revidal-GERDA, cuyo fin principal es la comunicación de efectos no deseados, con un mínimo de sesgo, para así contar con la información correcta en el lugar correcto y en el momento adecuado para mejorar la gestión de los pacientes [13, 35, 37-40], en especial porque varios estudios han demostrado que los problemas con el uso de productos cosméticos se pueden vincular a reacciones/efectos adversos [9, 21, 23, 42, 43]. Episodios más graves se han reportado en la literatura y directamente relacionados con clases particulares de cosméticos tales como perfumes o fragancias, tintes para el cabello y cosméticos para las axilas (antitranspirantes, blanqueadores) [23, 32, 37, 42-45]. A pesar de que se necesita más investigación para su confirmación, recientemente se ha sugerido que el uso de los cosméticos para axilas podría estar asociado a la aparición del cáncer de mama [2] así como se ha informado que los tintes para el cabello pueden inducir la aparición de cáncer de vejiga y el linfoma no Hodgkin [2, 27, 37, 46, 47].

Además de Revidal, algunas publicaciones que reportan la existencia de VigiDec (Vigilancia de dermatología estética y correctiva) creado por el Grupo de Dermatología Estética y Correctiva en Francia. VigiDec funciona mediante la centralización de la colección de los casos de efectos secundarios reportados por los miembros del grupo en su práctica o mediante un “registro de señales” [36, 37, 39-41].

Distribución temporal de las publicaciones sobre cosmetovigilancia

Las publicaciones encontradas en este estudio, han aumentado con el paso de los años a medida que ha ido cambiando la reglamentación sobre cosméticos. Existen muchos documentos derivados de diferentes normativas, como manuales o guías que las explican y aportan a su entendimiento y aplicación. La mayoría de estos documentos, aun-

que están avalados por agencias regulatorias, no identifican un año de publicación, sino que resaltan el año en el cual fue publicada la normativa a la que hacen alusión. Por otro lado, se encontró que desde 1997 hasta 2015 es el período de tiempo donde se ha venido desarrollando el concepto de cosmetovigilancia y la implementación de un sistema para tal propósito. La distribución de publicaciones por año de este período se presenta en la figura 2.

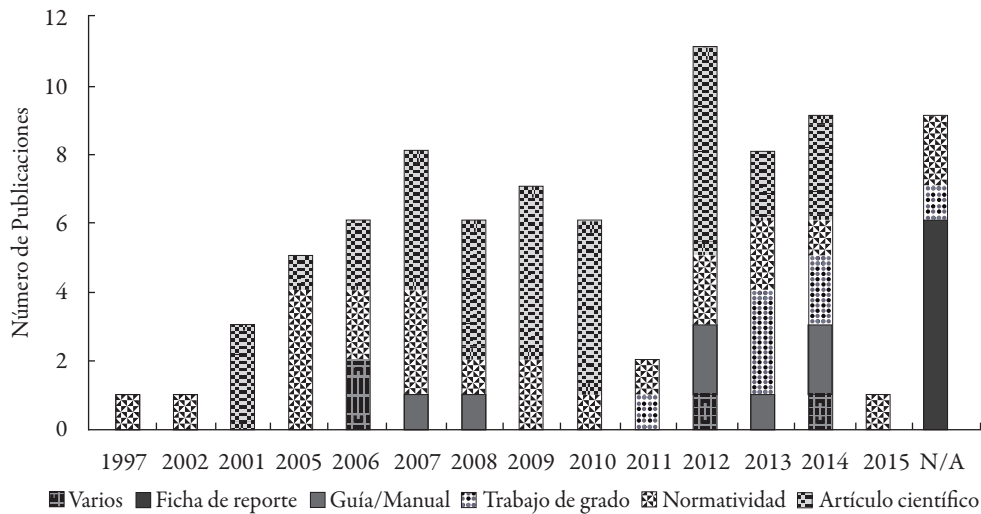


Figura 2. Evolución temporal de publicaciones realizadas sobre temas de cosmetovigilancia en el período 1997-2015.

Las publicaciones inician en 1997 cuando se publica en España el Real Decreto 1599/1997, que establece que los productos cosméticos que se comercialicen no deberán perjudicar la salud humana cuando se apliquen en las condiciones normales o razonablemente previsibles de su uso [14, 26, 48, 84]. Hacia el año 2002, dentro de los documentos seleccionados para esta revisión, solo uno de ellos es alusivo a Colombia, más exactamente a la Comunidad Andina de Naciones (CAN). Este documento es la Decisión 512 del 2002, donde se encuentra la definición de producto cosmético y en la que se establece que estos productos deben ser seguros cuando se les dé el uso normal o razonablemente previsible. Más allá de esta información, no existen reportes que sugieran investigación, implementación o desarrollo de un sistema de cosmetovigilancia, ni tampoco reglamentación que soporte bases para ello o exigencias del mismo.

En el año 2007 se publicaron diversos estudios donde se evaluaba la influencia de la implementación de la cosmetovigilancia en la Unión Europea, verificando los países que tienen un sistema en el cual se notifica voluntariamente y los que lo hacen con carácter reglamentario; encontrando que son más aquellos que realizan notificación

voluntaria, lo cual dificulta determinar la proporción de las personas que notifican, avances en el tema y los productos específicos que se ven más frecuentemente relacionados. Es por esto que se hace necesaria una reglamentación para la armonización de un sistema de cosmetovigilancia en la Unión Europea [44, 60, 65, 85], siendo el Reglamento N.º 1223, publicado en 2009, el cual obliga a la implementación de un sistema de cosmetovigilancia en cada país miembro de la Unión Europea.

Es en el año 2012 cuando se realizó la mayor cantidad de publicaciones referentes a cosmetovigilancia, ligadas a la implementación de las diferentes exigencias del reglamento del 2009 que entró en vigencia en el año 2013. En los años siguientes, además de la importante investigación en la Unión Europea al respecto, se publicaron trabajos de grado en Perú y Brasil. Así mismo, sale al público la Resolución- RDC N.º 48 de Brasil del 25 de octubre del 2013, donde se aprueba el *Reglamento Técnico de Buenas Prácticas de Fabricación para Artículos de Higiene Personal, Cosméticos y Perfumes, y de otras medidas*, con énfasis en la seguridad del uso de los productos cosméticos [8, 57, 62-64, 68, 79, 80, 86].

Un inconveniente observado tras la implementación del sistema, es debido al hecho de que a partir de marzo de 2013 fue totalmente prohibido llevar a cabo todo tipo de pruebas en animales en la Unión Europea, lo que significó para algunos el no poder llevar a cabo una completa vigilancia de posibles efectos adversos por el uso de productos cosméticos durante la fase investigación. Sin embargo, para los productos cosméticos en el mercado y cuya evaluación de seguridad ya existe, y han incluido las pruebas con animales, los resultados deben ser incluidos de igual manera pero se debe tener en cuenta que actualmente existen métodos alternativos a la experimentación con animales (Reglamento (CE) N.º 440/2008, por el que se establecen métodos de ensayo de acuerdo con el Reglamento REACH (CE) N.º 1907/2006) y que implica la evaluación *in vitro* (irritación de la piel/corrosión, fototoxicidad, la absorción cutánea, mutagénesis, entre otros). Incluso se están llevando a cabo esfuerzos para validar otros métodos alternativos ya que según esta reglamentación, no se aceptará la importación o venta en los estados miembros de productos terminados que hayan sido involucrados con la experimentación con animales.

De acuerdo con el Proyecto de Real Decreto del 2015 por el que se regulan los productos cosméticos, el concepto de cosmetovigilancia se encuentra en primera instancia acuñado a nivel europeo y abarca tanto los efectos graves no deseados, como los no graves, siendo estos últimos esenciales para detectar señales de forma temprana y adoptar medidas de protección cuanto antes. Por ello, los profesionales sanitarios deben notificar efectos no deseados sin la precisión “graves”, ya que el término es subjetivo y por ende se puede perder información importante sobre la seguridad de estos productos,

si no se reportan aquellos efectos adversos que bajo la opinión del profesional no sean “graves” [23, 45, 87].

Propuestas para la evaluación de los efectos graves no deseados producidos por cosméticos

Otro factor importante para la investigación y así mismo la publicación de artículos científicos, es el método a utilizado para analizar los efectos graves no deseados. Existe la propuesta hecha por COLIPA (Asociación Europea de Cosméticos, Artículos de Tocador y Perfumería) que proporciona las directrices para la evaluación de causalidad de estos efectos (Figura 3). Este método facilita la clasificación de estos efectos adversos según la gravedad mediante la información existente del evento como investigaciones médicas específicas y re-exposición al productos como tal [24, 25, 51, 52, 88]. Adicionalmente, existe un método diseñado originalmente para la calificación de causalidad, el Monitoreo Post-lanzamiento o Post-comercialización (PLM, Post Launch Monitoring) de los nuevos alimentos, pero que también ha sido empleado para evaluar la causalidad de los productos cosméticos [24, 25, 51, 52, 87]. De esta manera, COLIPA se refiere al análisis de la relación causal entre el uso del producto cosmético y la reacción, caso por caso, en un intento para determinar la probabilidad de que un producto, que siendo bien utilizado por el consumidor, sea responsable de un real acontecimiento indeseable. Por tanto, la evaluación de la causalidad es estrictamente individual y se relaciona con el efecto sobre el consumidor individualmente [7, 19, 22, 27, 35, 51-54, 58, 88].

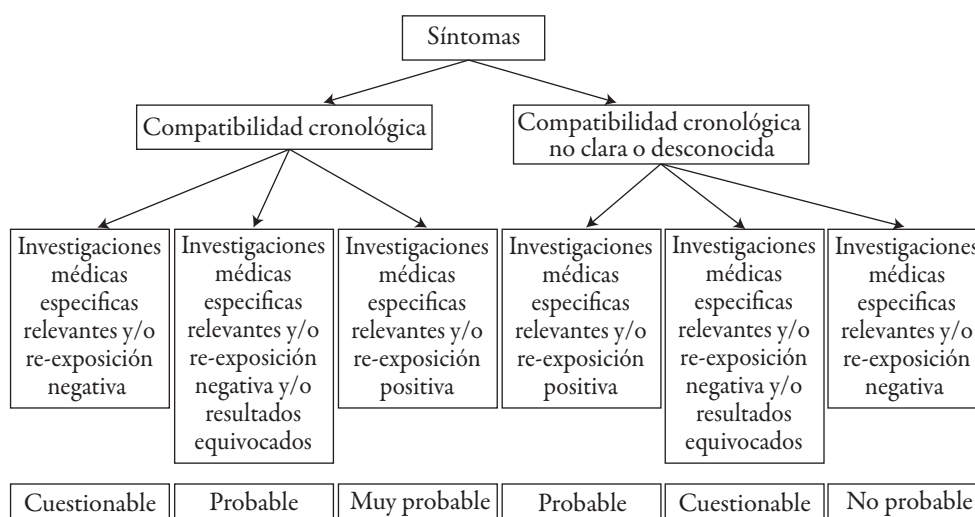


Figura 3. Evaluación de causalidad de acuerdo con el método propuesto por COLIPA. Adaptado de [46, 83].

CONCLUSIONES

La cosmetovigilancia es un concepto relativamente nuevo a pesar de que desde hace dos décadas atrás se han implementado sistemas de notificación voluntaria de efectos graves no deseados en países de la Unión Europea. Es un aspecto que ya se ha tornado de obligatorio cumplimiento en países que hacen parte de la Unión Europea con el fin de garantizar la seguridad de los consumidores.

Los años más representativos para la cosmetovigilancia fueron el 2005, el 2009 y el 2013 debido a la publicación de la Resolución 19/05 del Grupo de Mercado Común, el reglamento (CE) N.º 1223/2009 para la Unión Europea que entró en vigencia a partir del 2014. La Unión Europea es pionera en cuanto a reglamentación de cosméticos, seguida de Brasil, aunque es necesario seguir trabajando en ello para que pueda llevar a un sistema armonizado para todos los países miembros.

Dentro de esta revisión no se encontraron publicaciones de Ecuador y Bolivia sobre reglamentación, investigación o implementación de un sistema de cosmetovigilancia, mientras que para Colombia, únicamente se encuentra un reporte que hace el INVIMA sobre la realización de una prueba piloto de cosmetovigilancia del 2011.

DECLARACIÓN DE CONFLICTO DE INTERESES

Las autoras no declaran conflicto de intereses.

REFERENCIAS

1. P. Nobrega, "O estudo da notificação à vigilância sanitária dos eventos adversos causados por produtos cosméticos", tesis de grado, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2013, pp. 17-26.
2. C. Di Giovanni, V. Arcoraci, L. Gambardella, L. Sautebin, Cosmetovigilance survey: are cosmetics considered safe by consumers? *Pharmacological Research*, **53**, 16 (2006).
3. U. Moretti, G. Velo, Cosmetovigilance: the beautiful risk, *Drug Safety*, **31**, 437 (2008).

4. G. Nohynek, E. Antignac, T. Re, H. Toutain, Safety assessment of personal care products/cosmetics and their ingredients, *Toxicology and Applied Pharmacology*, **24**, 239 (2010).
5. I. Behrens, J. Chociai, A cosmetovigilância como instrumento para a garantia da qualidade na indústria de produtos cosméticos, *Visão Acadêmica*, **8**, 1518 (2007).
6. Comunidad Andina de Naciones (CAN), “Decisión 516 del 2002: armonización de legislaciones en materia de productos cosméticos”, 2002, pp. 1-2.
7. A. Dhavalshankh, G. Dhavalshankh, Cosmetovigilance: the study of prevalence and vigilance of adverse cutaneous reactions in hairdye users, *International Journal of Biological & Medical Research*, **3**, 1704 (2012).
8. Autoridad Regulatoria de Productos de Salud (HPRA), “Guide to cosmetics”, 2014, pp. 3-9.
9. S. Del Aguila, “Estrategias y limitantes para la implementación y desarrollo del sistema de cosmetovigilancia en el Perú”, tesis de grado, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, 2014, pp. 12-67.
10. L. Preud’Homme, A. Depues, S. Noiset, Cosmetic regulatory writing, *The European Medical Writers Association*, **23**, 186 (2014).
11. B. Bons, F. Audebert, C. Bitadeau, Assessment of undesirable events in cosmetic market surveillance: Background, description and use of a causality assessment method in cosmetovigilance, *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, **58**, 349 (2010).
12. G. Huf, P. Nobrega, R. Farias, M. Simões, Adverse reactions to cosmetic products and the notification system in health surveillance: a survey, *Rev. Bras. Epidemiol.*, **16**, 1017 (2013).
13. M. Vigan, Vigilance en dermatologie esthétique et correctrice, *Ann. Dermatol. Vénereol.*, **136**, Supplément 6, S375 (2009).
14. M. Marduga, El papel de la cosmética: excipientes y conservantes, *Pediatría de Atención Primaria*, **11**, Suplemento 15, 81 (2009).
15. Regulation (EC) N. ° 1223/2009 of the European parliament and the council. 30 november 2009. OJ L 342, 22.12.2009, p. 59.
16. The Federal Food, Drug & Cosmetics Act (FD&C Act), Título 21, Capítulo 9, FDA.

17. Resolución 092 de 1994, Grupo Mercado Común (GMC), 1994.
18. Acta V Reunión 2011: Expertos gubernamentales para la armonización de las legislaciones sanitarias, CAN, 2011.
19. A. Pochet, Actualités réglementaires relatives aux produits cosmétiques, *Ann. Dermatol. Veneréol.*, **134**, 2S46 (2007).
20. Comisión Europea, Decisión de ejecución de la comisión de 25 de noviembre de 2013 sobre las directrices relativas al anexo I del reglamento (ce) N. ° 1223/2009, 2013, pp. 1-24,
21. Agencia Francesa de Seguridad Sanitaria de los Productos de la Salud (AFS-SAPS), Bulletin d'information des vigilances N. °33, 2008, pp. 1-2.
22. E. Tancrede-Bohin, C. Henry, S. Lefort, S. Siest, Vigilance das l'industrie cosmétique, *Ann. Dermatol. Veneréol.*, **132**, 9S71 (2005).
23. M. Vigan, Réglementation européenne des cosmétiques, *EMC-Dermatologie Cosmétologie*, **1**, 154 (2004).
24. Comisión Europea, Directrices para la comunicación de efectos graves no deseados, 2009, pp. 1-10.
25. European Commission, SUE reporting guidelines, 2012, pp. 1-19.
26. M.Ferrer,I.Martinez,Lavigilanciaenfarmacia, *GranadaFarmacéutica*, **1**, 10(2006).
27. S. Kornfeld-Lecanu, F. Zajaczkowski, S. Dubourg, L. Martin, S. Lefort, S. Siest, Vigilance in industry: cosmetics and household cleaning products. Balance sheet of case report from 2005 to 2007, *Clinical and Experimental Dermatology*, **35**, 874 (2010).
28. Ministerio de Salud Pública, Resolución 19/05 del Grupo Mercado Común del MERCOSUR, 2007, pp. 1-4.
29. Sistema Argentino de Información Jurídica, Programa de cosmetovigilancia en el área de productos de higiene personal, cosméticos y perfumes, 2005, pp 1-2.
30. Agencia Nacional de Vigilancia Sanitaria (Anvisa), Resolução-RDC N. ° 332, de 1 de Dezembro de 2005, 2005, pp. 1-2.

31. L. Sautebin, E. Fabbri, P. Alessandro, M. Marletta, Regulation (EC) N. ° 1223/2009 on cosmetic products ('Cosmetics Regulation'): The European Cosmetovigilance System, *Serious Undesirable Effects Reporting Guidelines and notification Forms*, **84**, 291 (2004).
32. B. Berne, M. Tammela, G. Färm, A. Innerot, M. Lindberg, Can the reporting of adverse skin reactions to cosmetics be improved? A prospective clinical study using a structured protocol, *Contact Dermatitis*, **58**, 223 (2008).
33. Comisión Europea, Summary EC Cosmetovigilance workshop: 14-15 May 2012, Bruselas, 2012, pp. 1-2.
34. A. Guichard, B. Thanacody, P. Girardin, M. Vigan, P. Humbert, Cosmétovigilance: Analyse rétrospective de l'expérience franc-comtoise et comparaison avec le fichier nationale, *Annales de Dermatologie et de Vénérologie*, **139**, B122 (2012).
35. M. Vigan, Pourquoi et comment participer à la vigilance dermatoallergologique?, *Revue Française d'Allergologie*, **52**, 160 (2012).
36. Gerda, Le CHU Hôpitaux de Bordeaux, La cosmétovigilance, URL: <https://www.chu-bordeaux.fr/ESPACE-MEDIA/Archives/La-cosm%E9tovigilance/>, consultado en septiembre de 2015.
37. A. Pons-Guiraud, C. Frick, N. Golstein, D. Sabouraud, Allergie et cosmétiques, *Revue Francaise d'Allergologie et d'Immunologie Clinique*, **44**, 682 (2004).
38. M. Vigan, Cosmetovigilance and skin allergy. The French experience, *Contact Dermatitis*, **63**, 1 (2010).
39. N. Roos, M. Vigan, Modalités pratiques de déclaration d'un incident à la vigilance, *Annales de Dermatologie*, **136**, Supplément 6, S381 (2009).
40. M. Vigan, Vigilance en dermatologie esthétique et correctrice, *Ann. Dermatol. Venerol.*, **135**, S215 (2008).
41. L. Sportiello, S. Cammarota, S. de Portu, L. Sautebin, Notification of undesirable effects of cosmetics and toiletries, *Pharmacological Research*, **59**, 101 (2009).
42. P. Ferret, M. Gomez, M. Galonnier, Safety evaluation of cosmetic products dedicated to children under 3 years old, *Toxicology Letters*, **21**, 1S, S43 (2012).

43. Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS), Garantías sanitarias de los productos cosméticos, 2012, pp 1-10.
44. M. Vigan, Cosmétovigilance en 2007, *Revue Francaise d'Allergologie et d'Immunologie Clinique*, **47**, 228 (2007).
45. L. Sautebin, A cosmetovigilance survey in Europe, *Pharmacological Research*, **55**, 455 (2007).
46. D. Maiz, Iris, expert en cosmétovigilance, *Parfums Cosmétiques Actualités*, **205**, 144 (2009).
47. A. Aliaga, Dermofarmacia: generalidades y legislación, *Aula Farmacéutica*, **1**, 70 (2004).
48. A. Aliaga, Cosmetovigilancia, *Más. Dermatol.*, **11**, 2 (2010).
49. D. Marzin, H. Ficheux, La cosmétologie et les sciences pharmaceutiques, *L'Observatoire (La lettre de l'Académie nationale de pharmacie)*, **31**, 1 (2014).
50. Agencia Francesa de Seguridad Sanitaria de los Productos de la Salud (AFS-SAPS), Comité de coordination des vigilances des produits de santé: Principaux faits marquants, pp 9-14.
51. M. Vigan, F. Castelain, Cosmetovigilance: Definition, regulation and use "in practice", *Eur. J. Dermatol.*, **24**(6), 643 (2014).
52. Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS), Proyecto de Real Decreto por el que se regulan los productos cosméticos, 2013, pp. 1-9.
53. Agencia Francesa de Seguridad Sanitaria de los Productos de la Salud (AFS-SAPS), Cosmetovigilance: bilas des effets indésirables declares a l'AFSSAPS en 2010, 2010, pp. 3-10.
54. Agencia Francesa de Seguridad Sanitaria de los Productos de la Salud (AFS-SAPS), Article L-5131-9 (versión abrogé au 26 février 2014, code de la sante publique), URL: <http://www.legifrance.gouv.fr/affichCodeArticle.do?cidTexte=LEGITEXT000006072665&cidArticle=LEGIARTI000006690120&dateTexte=&categorieLien=cid>, consultado en septiembre de 2015.
55. Consejo Europeo (Comité de Ministros), Resolution ResAP(2006)1 on a vigilance system for undesirable effects of cosmetic products ("cosmetovigilance") in Europe in order to protect public health, 2006, pp. 1-7.

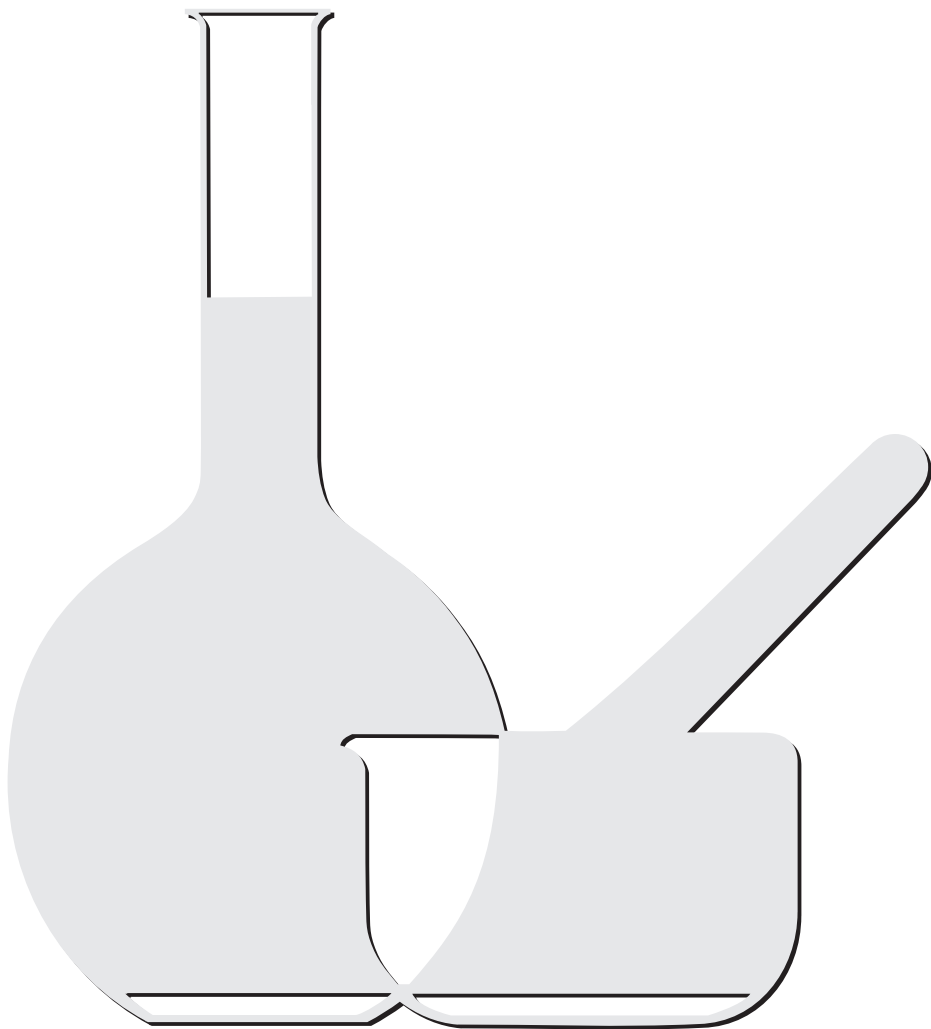
56. Consejo Europeo (Comité de Ministros), Résolution ResAP(2006)1 relative à un système de veille concernant les effets indésirables des produits cosmétiques («cosmétovigilance») en Europe destiné à protéger la santé publique, 2006, pp. 1-15.
57. J. Salverda, P. Bragt, L. Wit-Bos, T. Rustemeyer, P. Coenraads, R. Tupker, Results of a cosmetovigilance survey in the Netherlands, *Contact Dermatitis*, **68**, 139 (2013).
58. M. Tammela, M. Lindberg, M. Isaksson, A. Inerot, J. Rudel, B. Berne, Patch testing with own cosmetics – a prospective study of testing and reporting of adverse effects to the Swedish Medical Products Agency, *Contact Dermatitis*, **67**, 42 (2012).
59. L. Sautebin, Understanding the adverse effects of cosmetics: a pilot project in cosmetovigilance, *Drug Safety*, **31**, 433 (2008).
60. Mercosur (Grupo Mercado Común), Reglamento técnico Mercosur sobre rotulado obligatorio general para productos de higiene personal, cosméticos y perfumes, 2005, p. 1.
61. Agencia Nacional de Vigilancia Sanitaria (Anvisa), Consejo Regional de Química- IV Região (SP), Manual de Cosmetovigilância, 2008, p. 8-19.
62. Conselho Regional de Química 4 Região- CRQ-IV, Transcrição das fitas gravadas durante o workshop cosmetovigilância, 2006, p. 1-110.
63. A. Candioto, A. Freire, A. Von Borell, “Reações adversas a cosméticos e o profissional da estética”, tesis de grado, Universidade do Vale do Itajaí, pp. 3-12.
64. Mercosur (Grupo Mercado Común), Regulamento técnico Mercosul de boas práticas de fabricação para produtos de higiene pessoal, cosméticos e perfumes (Revogação das res. GMC N. ° 92/94 e 66/96), Resolución 19/11, 2011, pp. 2-5.
65. Mercosur (Grupo Mercado Común), Detalle de la norma Resolución 19/2005, 2005, pp. 1-3.
66. Agencia Nacional de Vigilancia Sanitaria (Anvisa), Manual de Cosmetovigilância, 2007, pp. 15-22.
67. S. Aquino, G. Spina, M. Zago, Proibição do uso de animais em testes cosméticos no estado de São Paulo: Novos desafios para a indústria de cosméticos e stakeholders, Anais do III SINGEP e II S2IS, 2014, pp. 4-7.
68. Agencia Nacional de Vigilancia Sanitaria (Anvisa), Relatório anual de actividades, 2006, pp. 126

69. Colegio Oficial de Farmacéuticos de Madrid, Ficha de cosmetovigilancia, URL: www.cofm.es, consultado en septiembre de 2015.
70. A. Raimundo, “Produtos cosméticos e de higiene corporal; enquadramento regulamentar”, tesis de grado, Instituição Ordem Dos Farmacêuticos, 2013, pp. 6-12.
71. B. Huayhuas, “Desenvolvimento de sensores descartáveis de ouro nanoestruturado modificados com complexo metálico visando detecção in situ de corantes semipermanentes de cabelo”, tesis de grado, Universidade Estadual Paulista (UNESP), 2014, pp. 20-22.
72. E. Cavalli, L. Sousa, “A redução de problemas de qualidade através da utilização de dados de reclamação do consumidor: estudo descritivo em indústria cosmética”, tesis de grado, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, 2013, pp. 11-34.
73. A. Donella, C. Fiashi, N. Barbosa, R. Jacomini, “Cosmetovigilância-SAC”, tesis de grado, Universidade do Grande ABC, 2011, pp. 4-6.
74. Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica (ANMAT), Cosmetovigilancia: formulario para el reporte de un producto cosmético, URL: http://www.anmat.gov.ar/cosmeticos/formulario_cosmetovigilancia.pdf, consultado en septiembre de 2015.
75. Instituto de Salud Pública, Ministerio de Salud, Gobierno de Chile, Formulario de denuncia a la calidad de medicamentos o cosméticos, URL: http://www.ispch.cl/sites/default/files/u7/H.2%20Matriz_PDF_10_1.pdf, consultado en septiembre de 2015.
76. Organización Farmacéutica Oficial (Portalfarma), Ficha de cosmetovigilancia, URL: <http://www.portalfarma.com/Profesionales/parafarmacia/dermofarmacia/alertas/Paginas/fichadecosmetovigilancia.aspx>, consultado en septiembre de 2015.
77. Farmacia Institucional, Universidad de la República, Nodo odontología de farmacovigilancia, cosmetovigilancia y materiovigilancia, URL: www.odon.edu.uy/catedras/Formulario%20Medicamento.do, consultado en septiembre de 2015.
78. Applications Médicales Internationales Laboratoires, Annexe: fiche de déclarations d'effets indésirables suite à l'utilisation d'un produit cosmétique, URL: <http://www.labo-ami.com/Cosmetovigilance-AMI.pdf>, consultado en septiembre de 2015.

79. Federation Francaise Parfumerie Sélective, Guides pratiques d'application du réglement cosmétique, 2013, pp. 11-16.
80. Instituto Nacional de Vigilancia de Medicamentos y Alimentos-INVIMA, Consolidado de preguntas y respuestas de la audiencia pública de rendición de cuentas del INVIMA realizada el 22 de noviembre de 2011, URL https://www.invima.gov.co/images/pdf/nuestra-entidad/Gestion/Informes-de-Gestion/consolidado_preguntas_respuestas_audiencia_2011.pdf, consultado en julio de 2016
81. Instituto Nacional de Salud Pública y Medioambiente, Cosmetovigilance in the Netherlands, 2012, pp. 3-14.
82. Instituto Nacional de Salud Pública y Medioambiente, Cosmetovigilance in the Netherlands: overview of the period 2009-2014, 2014, pp. 3-14.
83. Directorio General de Empresas e Industria- Comisión Europea, Impact of European Regulation on the EU Cosmetics Industry, 2007, pp. 27-37.
84. Ministerio de Sanidad y Consumo (España, UE), Real Decreto 1599/1997, de 17 de octubre, que recoge la regulación de productos cosméticos, 1997, pp 1-30.
85. Mercosur (Grupo Mercado Común), Decreto N° 424/007, 2007, pp 1-4.
86. Agencia Nacional de Vigilancia Sanitaria (Anvisa-Brasil), Resolução –RDC N° 48, de 25 de Outubro de 2013, 2013, pp. 1-3.
87. Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad (Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios, AEMPS), Proyecto de Real Decreto por el que se regulan los productos cosméticos, 2015, pp. 1-21.
88. P. Zweers, N. Gilmour, P. Hepburn, R. Gerritsen, E. van Puijenbroek, Causality methods in cosmetovigilance: Comparison of Colipa and PLM versus global introspection, *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, **63**, 409 (2012)

CÓMO CITAR ESTE ARTÍCULO

P.N. Cáceres-Guevara, K.L. Lang, M. Aragón-Novoa, Cosmetovigilancia: un estudio de alcance, *Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm.*, **45**(2), 305-327 (2016).



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

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

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

Los datos espectroscópicos se deben presentar de la siguiente manera:

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

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 anexarán en hojas separadas con su respectiva descripción.

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

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

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

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

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

Libros: Iniciales del nombre y apellido completo de los autores, título del libro entre comillas, editorial, ciudad, año, volumen y página. Ej.:

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

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

4. A.D. Elbein, R.J. Molyneux, The chemistry and biochemistry of simple indolizidine and related polyhydroxy alkaloids. En: "Alkaloids: Chemical and Biological Perspectives", Ed. por S.W. Pelletier, Wiley, New York, 1987, Vol. 5, pp. 1-54.

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

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

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

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

La correspondencia debe enviarse a la siguiente dirección:

Comité Editorial

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

Cra. 30 N.º 45-03
Fax: 57-1-3165060
Bogotá – Colombia
Correo electrónico:
rcciquifa_fcbog@unal.edu.co

Dirección WEB:

<http://www.revistas.unal.edu.co/index.php/rcciquifa>

Igualmente, los manuscritos pueden enviarse al correo electrónico:
rcciquifa_fcbog@unal.edu.co

Revista Colombiana
de Ciencias Químico-Farmacéuticas, 45(2)
se terminó de imprimir y encuadernar
en Proceditor, sobre papel bond de 90 gramos
Bogotá, D. C., Colombia.

