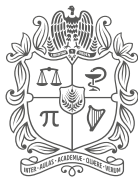


Facultad de Ciencias
Sede Bogotá

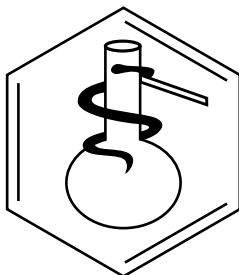


UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

Fondo gráfico que muestra un frasco de Erlenmeyer y un tubo de ensayo en un laboratorio.

**REVISTA COLOMBIANA
DE CIENCIAS QUÍMICO-FARMACÉUTICAS**

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias
Departamento de Farmacia



REVISTA COLOMBIANA DE CIENCIAS QUÍMICO-FARMACÉUTICAS

Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ciencias, Departamento de Farmacia.
ISSN 0034-7418, Fax: 3165060, Cra. 30 No. 45-03, Ed. 450, Bogotá, D. C., Colombia.

Correo electrónico: rciquifa_fcbog@unal.edu.co

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

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

<https://scholar.google.com/citations?user=TvBT68sAAAAJ&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. Irache, Ph. D., Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica, Facultad de Farmacia, Universidad de Navarra, España.

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

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

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

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

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

Comité Editorial:

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

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

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

Fernão Castro Braga, Ph. D., Departamento de Produtos Farmacéuticos, 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.

Constain H. Salamanca, Ph. D., Departamento de Farmacia, Facultad de Ciencias, Universidad Icesi, Cali, Colombia.

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

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

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

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

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

María B. Niñez, Ph. D., Laboratorio de Farmacognosia y Tecnología Farmacéutica, Departamento de Ciencias Básicas y Aplicadas, Universidad Nacional del Chaco Austral, Presidencia Roque Sáenz Peña, Chaco, Argentina.

Ovidio A. Almanza, Ph. D., Departamento de Física, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, D. C., Colombia.

Pablo A. Evelson, Ph. D., Departamento de Química Analítica y Físicoquímica, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires, Argentina.

Sergio Teves, Ph. D., Departamento de Microbiología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires, 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.

Edición, armada electrónica e impresión: Procceditor Ltda., Bogotá.

Teléfonos: 757 9200. Fax: ext. 102. Correo electrónico: procceditor@yaboo.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 conso-

lidación 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/rciquifa>

Contenido

Antibacterial activity of <i>Cordia dentata</i> Poir, <i>Heliotropium indicum</i> Linn and <i>Momordica charantia</i> Linn from the Northern Colombian Coast Leonor Cervantes Ceballos, Fredys Sánchez Hoyos, Harold Gómez Estrada	143
Actividad antibacteriana <i>in vitro</i> de aceites esenciales de diferentes especies del género <i>Citrus</i> Miladys Esther Torrenegra Alarcón, Nerlis Paola Pájaro, Glicerio León Méndez	160
Evaluación de la acción antiséptica de un jabón líquido utilizando algunos aceites esenciales como agente activo María del Rosario Osorio Fortich, Germán Eduardo Matiz Melo, Glicerio León Méndez, Darley López Olivares, Nerlis Paola Pájaro	176
A avaliação mecanística teórica da utilização de oxihidróxido de cobalto (III) em sensores eletroquímicos de tramadol Volodymyr V. Tkach, Yana G. Ivanushko, Sílvio C. de Oliveira, Reza Ojani, Petró I. Yagodynets'	188
Validación de una metodología analítica por HPLC-DAD para la cuantificación de cafeína en un ensayo de permeación <i>in vitro</i> empleando mucosa oral porcina Lina M. Sanabria, Jorge A. Martínez, Yolima Baena	202
Vanillin Schiff bases: Molecular interactions in methanol and THF solutions Shipra Baluja, Jayesh Javiya	220
Efecto de la fuerza de compresión sobre los atributos críticos de calidad en tabletas de liberación inmediata de furosemida Juan Camilo Fonseca, Paola Garzón López	235
The assessment of pharmaco-economic studies quality of Levodopa's use for the management of Parkinson's diseases, 2010-2015 Nelson H. Hermida Gutiérrez, Lina M. Sanabria Becerra, Jorge A. Díaz Rojas	256

Antibacterial activity of *Cordia dentata* Poir, *Heliotropium indicum* Linn and *Momordica* *charantia* Linn from the Northern Colombian Coast

Leonor Cervantes Ceballos¹, Fredys Sánchez Hoyos¹, Harold Gómez Estrada^{1*}

¹ Grupo de Investigación en Química de Medicamentos, Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Universidad de Cartagena, Cartagena, Colombia.

* E-mail address: hgomez@unicartagena.edu.co

Received: January 27, 2017

Accepted: July 15, 2017

SUMMARY

Cordia dentata Poir, *Heliotropium indicum* Linn and *Momordica charantia* Linn are used for treatment of the most common human diseases and health disorders in folk medicine of the population from the northern Colombian coast. In this study, chemical composition and antibacterial activity of the ethanol extract and fractions from *C. dentata*, *H. indicum* and *M. charantia* were investigated. The chemical constituents of qualitative detection were examined by Thin Layer Chromatography (TLC). The antibacterial activity was determined by agar gel diffusion and broth microdilution method. The main identified compounds were flavonoids, cardiac glycosides, alkaloids, saponins, terpenoids, tannins and coumarins. The minimal inhibitory concentration (MIC) was 31.25 to 1000 µg/mL for Gram-positive and Gram-negative bacteria, respectively. These results indicated that ethanol extract and fractions from *C. dentata*, *H. indicum* and *M. charantia* significantly inhibited the growth of standard strains. Potent antibacterial activities of *C. dentata*, *H. indicum* and *M. charantia* may be considered in future study, particularly against antibiotic-resistant cases.

Keywords: *Cordia dentata* Poir, *Heliotropium indicum* Linn, *Momordica charantia* Linn and Antibacterial activity.

RESUMEN

Actividad antibacterial de *Cordia dentata* Poir, *Heliotropium indicum* Linn y *Momordica charantia* Linn de la costa norte de Colombia

Cordia dentata Poir, *Heliotropium indicum* Linn y *Momordica charantia* Linn son usadas para el tratamiento de las enfermedades más comunes y trastornos de salud en la medicina popular de la población de la costa norte de Colombia. En este estudio se investigó la composición química y la actividad antibacterial de los extractos etanólicos y fracciones de *C. dentata*, *H. indicum* y *M. charantia*. Los constituyentes químicos se examinaron por detección cualitativa cromatografía de capa fina (TLC, por sus siglas en inglés). La actividad antibacterial se determinó por difusión en agar y microdilución en caldo. Los mayores compuestos identificados fueron flavonoides, glucósidos cardiotónicos, alcaloides, saponinas, terpenoides, taninos y cumarinas. La concentración inhibitoria mínima (MIC, por sus siglas en inglés) fue de 31,25 a 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, respectivamente. Estos resultados indican que el extracto etanólico y las fracciones de *C. dentata*, *H. indicum* y *M. charantia* inhibieron de manera significativa el crecimiento de las cepas estándar. La potente actividad antibacterial de *C. dentata*, *H. indicum* y *M. charantia* puede considerarse en posteriores estudios, en particular frente a casos de antibióticos resistentes.

Palabras clave: *Cordia dentata* Poir, *Heliotropium indicum* Linn, *Momordica charantia* Linn y actividad antibacterial.

INTRODUCTION

According to the World Health Organization (WHO), up to 90% of the population in developing countries uses plants and its products as traditional medicine for primary health care [1]. Colombia accounts for approximately 10% of the world's biodiversity and is home to about 50,000 species of plants [2]. The population of the northern coast, specifically in department of Bolívar use traditional medicine for treatment of skin affections, inflammation of the respiratory tract, and gastro-intestinal disorders (Figure 1) [3]. However, there is little scientific information about the properties of medicinal plants in this region of Colombia.



Figure 1. Photographs of plants: A. *Cordia dentata* Poir, B. *Heliotropium indicum* Linn, C. *Momordica charantia* Linn.

Cordia dentata Poir, is one of the species of plants to the family Boraginaceae little studied in the phytochemical and ethnopharmacological [4]. The genus *Cordia* has about 250 species [5, 6], *C. dentata* Poir is native to South and Central America [7], in Colombia it's distributed in the regions of Atlántico, Cundinamarca, Guajira, Magdalena, Meta and Bolívar, its local name is "uvito" [8]. The plant fruits are widely used as a traditional remedy for diseases such as intestinal parasites [4]. Several recent studies have revealed that the leaves and fruits of *C. dentata* contain a wide range of active compounds that are responsible for leishmaniacidal properties [9] and antinutritional factors in the diet of ruminants [10]. The accumulation of certain polyphenols (such as flavonoids, tannins, phenol acids and others) and their derivatives are mainly responsible for these potential health benefits [9, 11, 12]. *Heliotropium indicum* Linn (Boraginaceae) is an herbaceous plant popularly known as Indian heliotrope, has a pantropical distribution and is usually regarded as a weed. Widely distributed in South America, Asia [13] and Africa [14]. In Colombia it's distributed in the regions of Atlántico, Amazonas, Bolívar, Cauca, Cundinamarca, Meta and Norte de Santander, its local name is "Rabo de alacrán" and "verbena" [3, 8]. This plant is widely used as traditional remedy for several diseases such as intestinal parasites [3], amenorrhea, high blood pressure [15], abdominal pain, convulsion, cataract, conjunctivitis [16] and treatment cancer in Peru [17]. The chemical components of *H. indicum* included flavonoids, terpenoids, glycosides, steroids, saponins, tannins, pyrrolizidine alkaloid and phenolic compounds related to anti-glaucomas [14], anthelmintic [18], anti-inflammatory, rheumatism, anti-tumor [19], antileishmanial, hemolytic and toxicological activities [9].

Momordica charantia Linn (Cucurbitaceae) is an herbaceous plant popularly known as bitter gourd or karela in India. This plant is distributed in Asia, South America, and East Africa [20]. In Colombia it's distributed in all national territory, its local name is "balsamina" [3]. The fruit is used as traditional remedy for the treatment of diabetes, cardiovascular diseases [21] and its aerial parts in infusion for intestinal parasites

diseases), it often used as a vegetable in diet [3]. Several studies have demonstrated antibacterial, antiviral, anticancer, and antidiabetic activities [21, 22-24].

The aim of the present study was to evaluate the antibacterial activities of the ethanol extract and various fractions with chloroform, ethyl acetate, hexane and methanol obtained from the leaves of *Cordia dentata* Poir, *Heliotropium indicum* Linn and *Momordica charantia* Linn by determining the minimal inhibitory concentration (MIC) and minimal bactericidal concentration (MBC).

METHODS

Plants materials

Plants were collected in the department of Bolívar, on the northern coast of Colombia. The study region is located between 75°15' and 75°45' West longitude and between 10°10' and 10°40' North latitude; sector the Boquilla in the city of Cartagena and San Basilio de Palenque, in February and March 2014. Botanical identification was performed by botanists at the Institute of Botany from the University of Antioquia-Colombia and voucher specimens were retained in the herbarium (*C. dentata* P. number: 19558, *H. indicum* L. number: 95580, *M. charantia* L. number: 85570).

Preparation of extracts

The extraction process was performed using the cold percolation method. The *C. dentata*, *H. indicum* and *M. charantia* leaves were dried at room temperature, and then were ground with a blender. A sample (300 g) of each powder was macerated in 98% ethanol (3L) during 4 days in room temperature. The crude extracts were obtained after of the filtration after filtration with whatman N° 1 filter paper, and were evaporated under at low pressure at below 55 °C in a rotor evaporator *Heidolph* model *Hei-Vap* precision (250 mbar) [11, 25].

Preparation of fraction

The EtOH extract of *C. dentata*, *H. indicum* and *M. charantia* was concentrated and then partitioned with Hexane, CH₂Cl₂, EtOAc and Methanol respectively. The Hexane soluble extract was subjected to silica gel chromatography column and eluted with mixture of Hexane- CH₂Cl₂ (1:1), CH₂Cl₂ (1), CH₂Cl₂ - EtOAc (1:1), EtOAc (1), EtOAc - MeOH (1:1) allows obtaining five fractions.

Phytochemical screening

The qualitative detection of secondary metabolites was examined by thin Layer Chromatography (TLC) silica gel 60 GF254 plate. TLC plates were detected under UV $\lambda = 254$ and $\lambda = 366$ nm [9, 11, 26].

Test microorganisms

The microorganisms used in the study were obtained from the American Type Culture Collectionn (ATCC): *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 13883), *Escherichia coli* (ATCC 25922) and *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853).

Antibacterial activity assay

Antibacterial activity was determined by modified agar gel diffusion method [27]. Autoclaved Mueller-Hinton agar (MHA) was poured into sterile Petri dishes and solidified into plate. The inoculated plates were incubated at 37 °C for 24 hours. 10 μ L of ethanol extract or fractions were aseptically placed on top of the agar layer, and the plates were incubated at 37 °C for 24 hours. The antibacterial activity was evaluated by measuring the diameter of inhibition zone. Standard antibiotic kanamycin, tetracycline and ampicillin (20 μ g/mL), 10 μ L DMSO solution used as a negative control. All the antimicrobial tests were performed in triplicate and the results were reported as mean \pm standard deviation of three replicates.

Determination of minimum inhibitory concentration and minimum bactericidal concentration

The MIC and MBC of extracts and fractions were evaluated by the microdilution method with slight modifications [28-30], and the Clinical and Laboratory Standards Institute [31]. In brief, a series of ethanol extract and fraction concentrations were prepared with the broth and 100 μ L of these solutions were added to sterile 96-well plates. Then 100 μ L aliquots of culture containing approximately 10⁶ CFU/mL of the tested microorganisms were added to set the final concentration of ethanol extract or each fraction at 1000, 500, 250, 125, 62.5 y 31.25 μ g/mL. The well only containing broth and inoculate was used as a negative control. The inoculated 96-well plates were incubated at 37 °C for 24 hours, cell growth was measured in a Multiskan Ascent spectrophotometer (Thermo Labsystems Oy, UK) at OD 620 nm. In this assay, each experiment was performed in triplicate. The MBC value was defined as the lowest concentration of ethanol extract or its fraction able to kill at least 99.9% of the bacterial inoculum within 24 hours [32]. In brief, the contents of well with value MIC and those with value above to MIC for each microorganism were plated sterile Petri dishes containing

MHA [33]. After incubation at 37 °C for 24 hours, the bacterial colonies on the Petri dishes were counted. In this assay, each experiment was performed in triplicate.

Statistical analysis

Each experiment was repeated three times. The results were expressed as the mean \pm SD. The data were subjected to analysis of variance (ANOVA) and the differences between means were determined by Tukey test ($P \leq 0.05$), using Graph Pad Prism 5.0.

RESULTS AND DISCUSSION

Phytochemical screening of *C. dendata* Poir, *H. indicum* Linn and *M. charantia* Linn

Phytochemical constituents are shown in Table 1. Terpenoids were observed in all the extract and fractions of three medicinal plants, while alkaloids were present in ethanol extract. Further analysis showed that dichloromethane fractions contained rich saponins and cardiac glycosides. Ethyl acetate fraction enriched flavonoid, tannins and coumarins.

Antibacterial activity

The antibacterial activity is shown in Table 2, 3 and 4. Our results showed *C. dendata*, *H. indicum* and *M. charantia* ethanol extract and fractions exhibited varying degrees of antibacterial activity against the tested microorganisms. *C. dendata* inhibited 4 out of 5 of the tested microorganisms. Hexane fraction showed high inhibitory activity against *P. aeruginosa* (21.3 ± 1.2 mm), ethyl acetate fraction activity against *S. epidermidis* (19.8 ± 1.1 mm) and *K. pneumoniae* (12.8 ± 0.5 mm), dichloromethane fraction against *S. aureus* (15.2 ± 1.3 mm). Ethanol extract and fractions were not effective against *E. coli* (Table 2). *H. indicum* hexane fraction showed antimicrobial effects only against *S. aureus* (9.2 ± 1 mm) and *P. aeruginosa* (10.8 ± 0.8 mm). Ethanol extract and fractions, Dichloromethane fraction, Ethyl acetate fraction, Methanol fraction were not effective against *S. epidermidis*, *K. pneumoniae* and *E. coli* (Table 3). *M. charantia* dichloromethane fraction showed notable antibacterial activity against *S. aureus* (9.8 ± 1.2 mm), *S. epidermidis* (9.5 ± 0.6 mm), *P. aeruginosa* (8.9 ± 1.0 mm), ethanol extract and fractions exhibited against *K. pneumoniae* (7.7 ± 1.2 mm), ethanol extract and fractions were not effective against *E. coli* (Table 4).

Table 1. Phytoconstituents of the extract and fractions of *C. demadata* Poir, *H. indicum* Linn and *M. cbarantia* Linn.

Phytochemicals	Test	<i>C. demadata</i>					<i>H. indicum</i>					<i>M. cbarantia</i>					
		Ec	Hf	Df	Af	Mf	Ec	Hf	Df	Af	Mf	Ec	Hf	Df	Af	Mf	
Alkaloids	Mayer's test	+	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
	Drangandroff's test	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
	Wagner's test	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
Flavonoids	Citric acid boric test	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Tannins	FeCl ₃ test	-	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Coumarins	With aqueous KOH 5% solution	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Phytosterols	Liebermann Burchard test	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Saponins	Vanillin sulfuric acid test	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	SbCl ₃ test	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Cardiac glycosides	Baljet test	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Raymond's test	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Kedde's test	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Note. "+" sign denotes presence, and "-" sign denotes absence of the compound the plants. Ethanol extracts (Ec); Hexane fraction (Hf); Dichloromethane fraction (Df); Ethyl acetate fraction (Af); Methanol fraction (Mf). + Present, - Absent.

Table 2. Antibacterial activity of *C. dendata* by modified agar gel diffusion method.

Strains	Extract and fractions																													
	Ethanol						Hexane						Dichloromethane						Ethyl acetate						Methanol					
	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6
E	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
P	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
S	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
K	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+

Table 3. Antibacterial activity of *H. indicum* by modified agar gel diffusion method.

Strains	Extract and fractions																													
	Ethanol						Hexane						Dichloromethane						Ethyl acetate						Methanol					
	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6
E	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
P	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
K	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Strains: *Escherichia coli* (E); *Pseudomonas aeruginosa* (P); *Staphylococcus aureus* (A); *Staphylococcus epidermidis* (S); *Klebsiella pneumoniae* (K). Concentrations: 1 = 31.25 µg/mL; 2 = 62.5 µg/mL; 3 = 125 µg/mL; 4 = 250 µg/mL; 5 = 500 µg/mL; 6 = 1000 µg/mL. Inhibition zone < 6 mm no antibacterial activity (-); Inhibition zone > 6 mm: high antibacterial activity (+).

Table 4. Antibacterial activity of *M. charantia* by modified agar gel diffusion method.

Strains	Extract and fractions																													
	Ethanol						Hexane						Dichloromethane						Ethyl acetate						Methanol					
	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6
E	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
P	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
K	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Strains: *Escherichia coli* (E); *Pseudomonas aeruginosa* (P); *Staphylococcus aureus* (A); *Staphylococcus epidermidis* (S); *Klebsiella pneumoniae* (K). Concentrations: 1 = 31.25 $\mu\text{g/mL}$; 2 = 62.5 $\mu\text{g/mL}$; 3 = 125 $\mu\text{g/mL}$; 4 = 250 $\mu\text{g/mL}$; 5 = 500 $\mu\text{g/mL}$; 6 = 1000 $\mu\text{g/mL}$. Inhibition zone = < 6 mm no antibacterial activity (-); Inhibition zone = > 6 mm: high antibacterial activity (+).

MIC and MBC analyses

The MIC and MBC values are shown in Figures 2, 3 and 4. The MIC values of ethanol extract and the fractions ranged from 31.25 to 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$, exhibited significant antimicrobial activity ($P \leq 0.05$) when compared to positive control. Overall, ethanol extract and fractions of *C. dendata* and *M. charantia* exhibited a potent antibacterial activity from 50 at 99 % against *S. aureus*, *S. epidermidis*, *K. pneumoniae* and *P. aeruginosa* different at *H. indicum*, ethanol extract and fractions of the plants evaluated were not effective against *E. coli*. Ethyl acetate and hexane fraction of *C. dentata* showed maximum activity with MIC 31.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for *S. aureus*, *S. epidermidis* (500 $\mu\text{g}/\text{mL}$), *K. pneumoniae* and *P. aeruginosa* (1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$). In all cases, most of the MBC values were found to be equal or twice as high as the corresponding MIC values for *S. aureus* (Figure 2). Ethanol extract and fractions of *H. indicum* exhibited activity with MIC 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ against *S. aureus*, *S. epidermidis*, *K. pneumoniae* and *P. aeruginosa* (Figure 3). Dichloromethane and methanol fraction of *M. charantia* exhibited good activity with the MIC 62.5 and 125 $\mu\text{g}/\text{mL}$ against *S. aureus* and the MBC values were found to be equal or twice as high as the corresponding MIC values (Ethanol extract) (Figure 4).

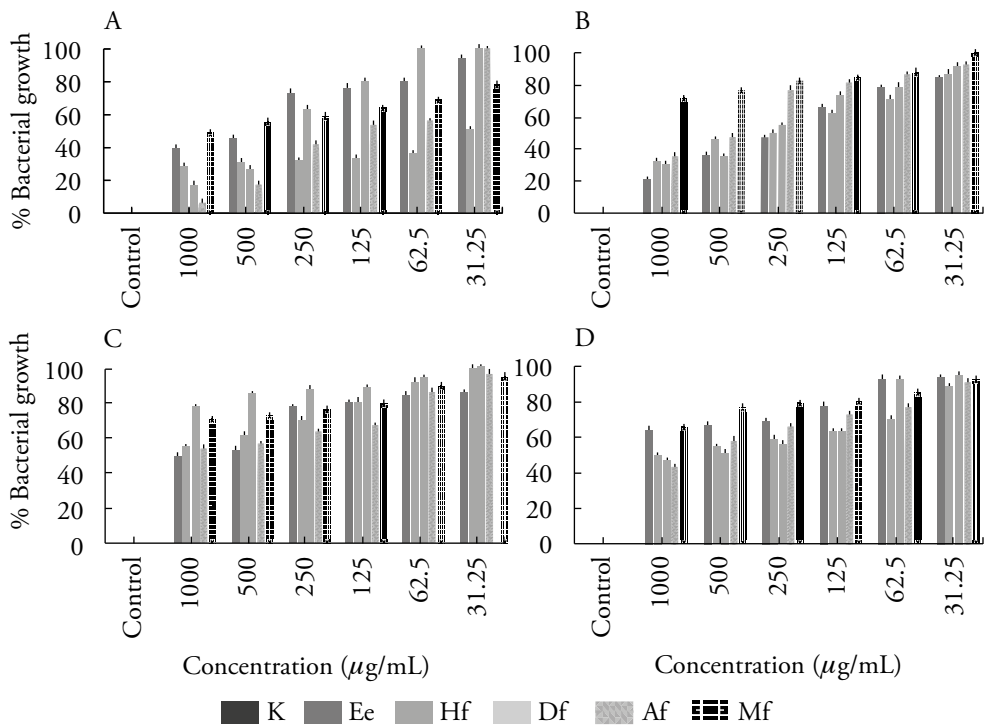


Figure 2. Antibacterial activity, MIC ($\mu\text{g}/\text{mL}$) and MBC ($\mu\text{g}/\text{mL}$) of the ethanol extract and fractions of *C. dendata* P. Strains: (A) *S. aureus*; (B) *S. epidermidis*; (C) *P. aeruginosa*; (D) *K. pneumoniae*. Kanamycin (K); Ethanol extract (Ee); Hexane fraction (Hf); Dichloromethane fraction (Df); Ethyl acetate fraction (Af); Methanol fraction (Mf).

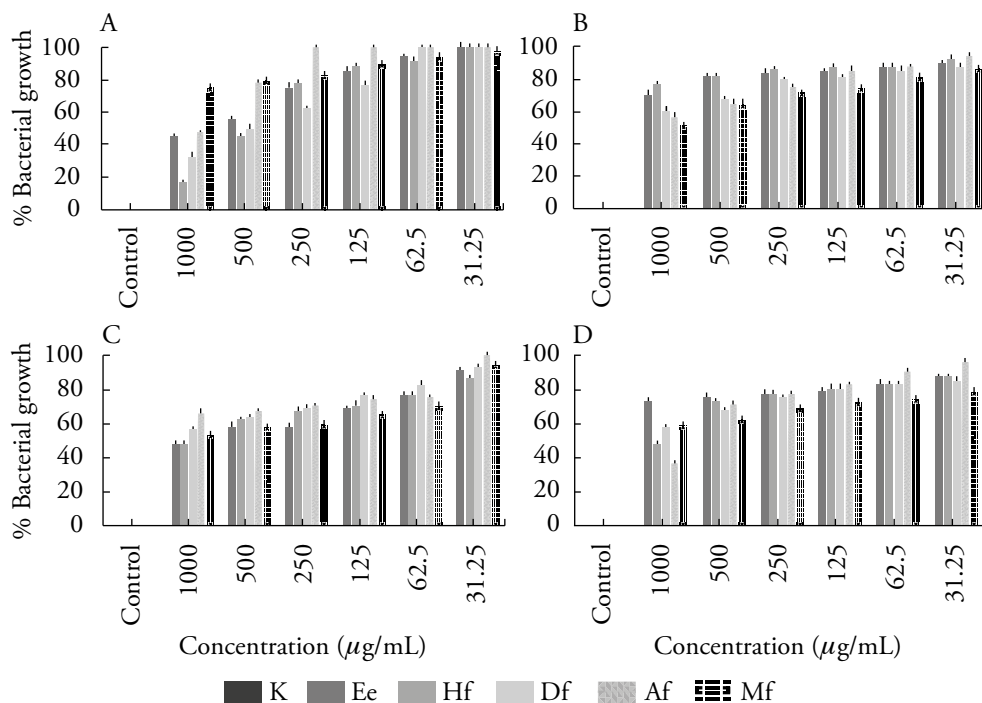


Figure 3. Antibacterial activity, MIC ($\mu\text{g/mL}$) and MBC ($\mu\text{g/mL}$) of the ethanol extract and fractions of *Heliotropium indicum* L. Strains: (A) *S. aureus*; (B) *S. epidermidis*; (C) *P. aeruginosa*; and *K. pneumoniae* (D). Kanamycin (K); Ethanol extract (Ee); Hexane fraction (Hf); Dichloromethane fraction (Df); Ethyl acetate fraction (Af); Methanol fraction (Mf).

The phytochemical analysis of the plants evaluated revealed the presence of flavonoids, cardiac glycosides, alkaloids, saponins, terpenoids, tannins and coumarins in the extract and fractions, as shown in Table 1. Each extract or fraction contains at least seven types of secondary metabolites, and some of the extract and fractions exhibited substantial antibacterial activities as shown by low MIC and MBC values against the tested microorganisms (Figures 2, 3 and 4). The secondary metabolites such as flavonoids and phenols are effective antibacterial substances due to their ability to form complexes with extra cellular and soluble proteins and to complex with bacterial cell walls leading to the death of the bacteria [34]. Terpenoids are known to have antibacterial property by affecting the synthesis of cell membranes components, prenylation of proteins and the use of carbon source [35]. The activities of these phytochemical components may be responsible for the antibacterial activities observed in the study. Largely, ethanol extract of *M. charantia* and ethyl acetate fractions of *C. dendata* with the MIC 1000 $\mu\text{g/mL}$ (95 at 100%) showed a broad spectrum antimicrobial activity against the tested bacteria, and polar fraction exhibited better bacterial activity against some tested bacteria like *S. aureus* (ATCC 25923). However, few studies antibacterial

of *C. dentata* and *H. indicum* activity. The leaf extracts (water, ethanol, and methanol) of *M. charantia* showed the broad-spectrum antimicrobial activity [36]. The studies *M. charantia* extracts/essential oils [37, 38], which possessed potential activity against *S. aureus*. Some of fractions, even at higher concentration (1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$), could not inhibit or kill most of the bacteria. We speculated these fractions or extract might have undiscovered inhibitory mechanism, or they only have bacteriostatic and no bactericidal effect. Most antibacterial studies have focused on activity of plant extracts, but few on the time-dependent stability of the activity [39]. This indicated the active principles in the ethanol extract and fractions had a relative short shelf life [40]. The leaves of *C. dentata* and *H. indicum* used in folk medicine of the population from the northern Colombian coast for the treatment of internal parasites, skin affections as eczema, pruritic ailments, abscess or other inflamed wounds, boils, dermatosis presumably caused by fungal or yeast infections, dry skin condition [3].

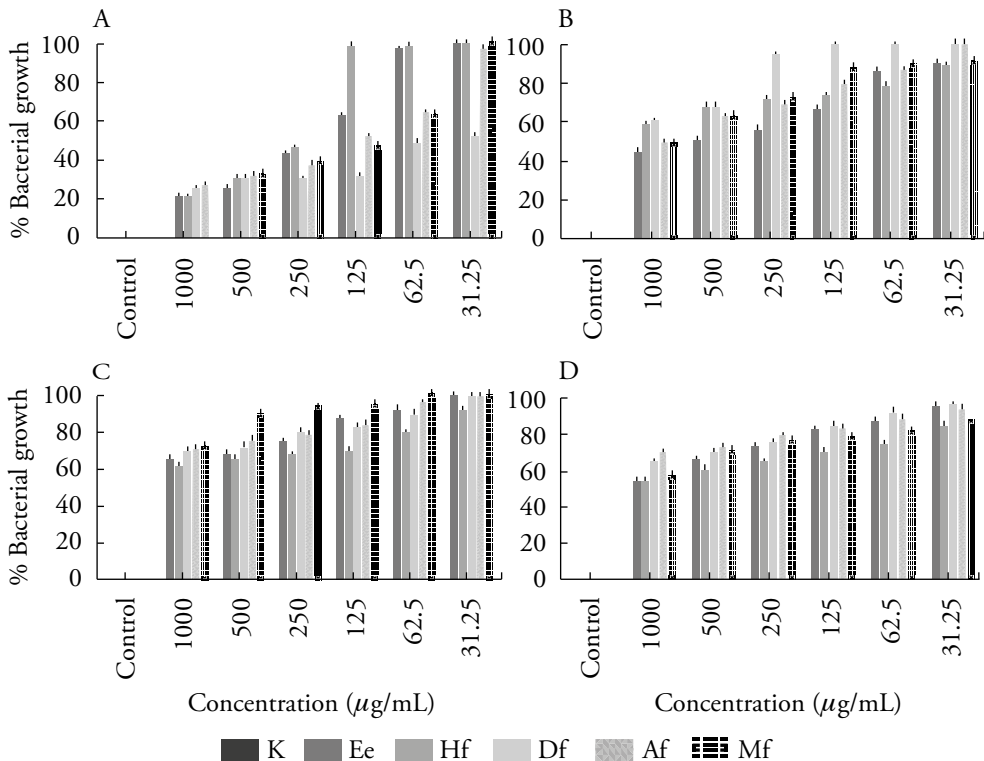


Figure 4. Antibacterial activity, MIC ($\mu\text{g}/\text{mL}$) and MBC ($\mu\text{g}/\text{mL}$) of the ethanol extract and fractions of *Momordica charantia* L. Strains: (A) *S. aureus*; (B) *S. epidermidis*; (C) *P. aeruginosa*; and *K. pneumoniae* (D). Kanamycin (K); Ethanol extract (Ee); Hexane fraction (Hf); Dichloromethane fraction (Df); Ethyl acetate fraction (Af); Methanol fraction (Mf).

CONCLUSION

The results of this assay showed that the ethanol extract and fractions of *C. dentata*, *H. indicum* and *M. charantia* the leaves exhibited activity bacteriostatic against the tested microorganisms *S. aureus*, *S. epidermidis*, *K. pneumoniae* and *P. aeruginosa* and not effective against *E. coli*. *C. dentata*, *H. indicum* and *M. charantia* medicinal plants from the Northern Colombian Coast have been shown to have promising *in vitro* antibacterial activity.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported by the University of Cartagena, Cartagena, and the Administrative National Department of Science, Technology and Innovation of Colombia, Bogotá, and (Colciencias, Grant 512-2012). The University of Cartagena (Cartagena), the Program to Support Research Groups, sponsored by the Vice-Rector for Research at the University of Cartagena (Grant RC 017-2015). The authors thank to the students Yesid Venecia, Jorge Sánchez Hoyos and Luis Miguel Moneris Meza from the University of Cartagena.

DISCLOSURE STATEMENT

No potential conflict of interest was reported by the authors.

REFERENCES

1. World Health Organization, Traditional medicine-growing needs and potential, *WHO Policy Perspective on Medicines*, 2, 1 (2002).
2. S.A. Caro, Ethnobotanical studies in the Central Andes (Colombia), Knowledge distribution of plant use according to informants characteristics, *Lyonia*, 7, 89 (2004).
3. H. Gómez-Estrada, F. Díaz-Castillo, L. Franco-Ospina, J. Mercado-Camargo, J. Guzmán-Ledezma, J. Medina, R. Gaitán-Ibarra, Folk medicine in the northern coast of Colombia: An overview, *J. Ethnobiol. Ethnomed.*, 7 (1), 27 (2011).
4. J. López-Sáez, J. Pérez-Soto, Etnobotánica medicinal y parasitosis intestinales en la isla de Ometepe, Nicaragua. Instituto Politécnico Nacional (México), *Polibotánica*, 30, 137 (2010).

5. L. Li, M. Li, L. Xu, N. Guo, T. Wu-Lan, R. Shi, Y. Peng, P. Xiao, Distribution of seven polyphenols in several medicinal plants of Boraginaceae in China, *J. Med. Plants Res.*, **4** (12), 1216 (2010).
6. Tropicos, *Cordia dentata* Poir. Tropicos.org, *Missouri Botanical Garden*. URL: <http://www.tropicos.org/Name/4001215>, consultado el 31 de agosto de 2011.
7. E. Retief, The genus *Cordia* L. (Boraginaceae: Cordioideae) in southern Africa, *South African J. Botany*, **74** (2), 389 (2008).
8. H. García-Barriga, “Flora medicinal de Colombia. Botánica médica” (tomo II), Talleres Editoriales de la Imprenta Nacional, Bogotá, 1974, p. 482.
9. J.E. Espitia, S.M. Robledo, B.S. Cuadrado, H. Durán, H.A. Gómez-Estrada, Perfil fitoquímico, actividad antileishmania, hemolítica y toxicológica de *Cordia dentata* Poir y *Heliotropium Indicum* L., *Rev. Cubana Plant. Med.*, **19** (3), 1 (2014).
10. A. García, B. Abadía, R. Barahona, S. Sánchez, Caracterización fitoquímica de factores antinutricionales en las hojas de uvito (*Cordia dentata* Poir), *Rev. MVZ Córdoba*, **14** (1), 1611 (2009).
11. C. Beltrán-Villanueva, H. Gómez-Estrada, F. Díaz, Tamizaje fitoquímico preliminar de especies de plantas promisorias de la Costa Atlántica colombiana, *Rev. Cubana Plant. Med.*, **18** (3), 1 (2013).
12. H. Gómez-Estrada, L. Germosén-Robineau, E. Nossin, “Estudio etnofarmacológico de las plantas medicinales usadas en el Caribe colombiano. Diálogo de saberes: plantas medicinales, salud y cosmovisiones”, Editorial ARFO Editores e Impresos Ltda., Leticia, Colombia, 2009, p. 135.
13. D.J. Soares, First report of *Oidium heliotropii-indici* on *Heliotropium indicum* from Brazil, *Australasian Plant Dis. Notes*, **5**, 87 (2010).
14. S. Kyei, Asumeng, G. Ramkisson, O. Owusu-Afriyie, Anti-glaucoma potential of *Heliotropium indicum* Linn in experimentally-induced glaucoma, *Eye and Vision*, **2**, 16 (2015).
15. A. Togola, D. Diallo, S. Dembélé, H. Barsett, B.S. Paulsen, Ethnopharmacological survey of different uses of seven medicinal plants from Mali, (West Africa) in the regions Doila, Kolokani and Siby, *J. Ethnobiol. Ethnomed.*, **1**, 7 (2005).

16. A. Banaszek, Company profits from side effects of glaucoma treatment, *CMAJ*, **183**(14), 1058 (2011).
17. J.A. Duke, R. Vázquez, “Amazonian ethnobotanical dictionary”, CRC Press, USA, 1994.
18. K. Mahato, B. Kakoti, S. Borah, M. Kumar, Evaluation of *in-vitro* anthelmintic activity of *Heliotropium indicum* Linn. leaves in Indian adult earthworm, *Asian Pacific J. Trop. Disease*, **4** (1), 2 (2014).
19. P. Taylor, M. Arsenak, M. Abad, A. Fernández, B. Milano *et al.*, Screening of Venezuelan medicinal plant extracts for cytostatic and cytotoxic activity against tumor cell lines, *Phytother. Res.*, **27**, 530 (2013).
20. R. Leung, J. Birtwhistle, S. Kotecha, S. Hannah, S. Cuthbertson, Anti-diabetic and hypoglycaemic effects of *Momordica charantia* (bitter melon): A mini review, *British J. Nutr.*, **102** (12), 1703 (2009).
21. S.I. Rizvi, N. Mishra, Traditional Indian medicines used for the management of diabetes mellitus, *J. Diabetes Res.*, 2013:712092 (2013), doi: 10.1155/2013/712092.
22. R. Gaitán, H. Gómez, S. Tapia, A.M. Villadiego, D. Méndez, Acido-11-hidroxi-kaur-16-en-19-óico, un nuevo Kaureno aislado de *Aristolochia anguicida*, *Rev. Latinoamer. Quím.*, **30** (3), 83 (2002).
23. J.K. Grover, S.P. Yadav, Pharmacological actions and potential uses of *Momordica charantia*: A review, *J. Ethnopharmacol.*, **93** (1), 123 (2004).
24. E. Basch, S. Gabardi, C. Ulbricht, Bitter melon (*Momordica charantia*): A review of efficacy and safety, *Am. J. Health Syst. Pharm.*, **60** (4), 356 (2003).
25. J.E. Espitia-Baena, H.R. Durán-Sandoval, J. Fandiño-Franky, F. Díaz-Castillo, H.A. Gómez-Estrada, Química y biología del extracto etanólico del epicarpio de *Crescentia cujete* L. (totumo), *Rev. Cubana Plant. Med.*, **16**, 337 (2011).
26. F. Díaz-Castillo, S. Morelos-Cardona, M. Carrascal-Medina, Y. Pájaro-González, H. Gómez-Estrada, Actividad larvívica de extractos etanólicos de *Tabernaemontana cymosa* y *Trichilia hirta* sobre larvas de estadio III y IV de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae), *Rev. Cubana Plant. Med.*, **17**, 256 (2012).

27. S.F. Vuuren, M.N. Nkwanyana, H. de Wet, Antimicrobial evaluation of plants used for the treatment of diarrhoea in a rural community in northern Maputaland, KwaZulu-Natal, South Africa, *BMC Compl. Alternat. Med.*, **15**, 53 (2015).
28. Z.X. Peng, B. Tu, Y. Shen, L. Du, L. Wang, S.R. Guo, T.T. Tang, Quaternized chitosan inhibits *icaA* transcription and biofilm formation by *Staphylococcus* on a titanium surface, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **55**, 860 (2011).
29. L. Franco-Ospina, G. Matiz-Melo, I. Pájaro-Bolívar, H. Gómez-Estrada, Actividad antibacteriana *in vitro* de extractos y fracciones de *Physalis peruviana* L. y *Caesalpinia pulcherrima* (L.) Swartz., *Boletín Latinoamer. Caribe Plant. Med. Aromát.*, **12**, 230 (2013).
30. L.A. Franco, Y.C. Ocampo, H.A. Gómez, R. de la Puerta, J.L. Espartero, Sucrose esters from *Physalis peruviana* calyces with anti-inflammatory activity, *Planta Medica*, **80** (17), 1605 (2014).
31. CLSI, Clinical and Laboratory Standards Institute CLSI, “Document M07-A9”, Wayne, 2012, p. 16.
32. D. Raafat, K. von Bargaen, A. Haas, H.G. Sahl, Insights into the mode of action of chitosan as an antibacterial compound, *Appl. Environ. Microbiol.*, **74**, 3764 (2008).
33. R.N. Jones, T.R. Fritsche, Y. Ge, K. Kaniga, H.S. Sader, Evaluation of PPI-090 3M (T91825), a novel cephalosporin: Bactericidal activity, effects of modifying *in vitro* testing parameters and optimization of disc diffusion tests, *J. Antimicrob. Chemother.*, **56**, 1047 (2005).
34. M. Cowan, Plant products as antimicrobial agents, *Clin. Microbiol. Rev.*, **12**, 564 (1999).
35. B.S. Nayak, D.D. Ramdath, J.R. Marshall, G.N. Isitor, M. Eversley, S. Xue, J. Shi, Wound healing activity of the skin of the common grape (*Vitis vinifera*) Variant, Cabernet Sauvignon, *Phytother. Res.*, **24**, 1151 (2010).
36. J. Saengsai, S. Kongtunjanphuk, N. Yoswatthana, T. Kummalue, W. Jiratchariyakul, Antibacterial and antiproliferative activities of plumericin, an iridoid isolated from *Momordica charantia* vine, *Evid.-Based Complem. Alternat. Med.*, **2015**, Article ID 823178 (2015), doi: 10.1155/2015/823178.

37. H.D. Coutinho, J.G. Costa, V.S. Falcão-Silva, J.P. Siqueira-Júnior, E.O. Lima, Effect of *Momordica charantia* L. in the resistance to aminoglycosides in methicillin-resistant *staphylococcus aureus*, *Comp. Immunol. Microbiol. Infect.*, **33**, 467 (2010).
38. T.S. Roopashree, R. Dang, R.H. Shobha-Rani, C. Narendra, Antibacterial activity of antipsoriatic herbs: *Cassia tora*, *Momordica charantia* and *Calendula officinalis*, *Int. J. Appl. Res. Nat. Prod.* **1**, 20 (2008).
39. N.P. Marathe, M.H. Rasane, H. Kumar, A.A. Patwardhan, Y.S. Shouche, S.S. Diwanay, *In vitro* antibacterial activity of *Tabernaemontana alternifolia* (Roxb) stem bark aqueous extracts against clinical isolates of methicillin resistant *Staphylococcus aureus*, *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.*, **12**, 26 (2013).
40. D. Cheng, Y. Zhang, D. Gao, H. Zhang, Antibacterial and anti-inflammatory activities of extract and fractions from *Pyrrosia petiolosa* (Christ et Bar.) Ching, *J. Ethnopharmacol.*, **155**, 1300 (2014).

HOW TO CITE THIS ARTICLE

L. Cervantes-Ceballos, F. Sánchez-Hoyos, H. Gómez-Estrada, Antibacterial activity of *Cordia dentata* Poir, *Heliotropium indicum* Linn and *Momordica charantia* Linn from the Northern Colombian Coast, *Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm.*, **42** (2), 143-159 (2017).

Actividad antibacteriana *in vitro* de aceites esenciales de diferentes especies del género *Citrus*

Miladys Esther Torrenegra Alarcón^{1a}, Nerlis Paola Pájaro^{2b}, Glicerio León Méndez^{3c}

¹ Grupo de Investigación de Biotecnología e Innovación (GIBEI), Centro de Comercio y Servicios, Sena, regional Bolívar, Ternera Km. 1 Vía Turbaco CTG, Cartagena, Bolívar, Colombia.

² Grupo de Ciencias Médicas y Farmacéuticas, Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad de Sucre, sede Puerta Blanca, calle 16B No. 13B-80, barrio La Pajuela, Sincelejo, Sucre, Colombia.

³ Grupo de Investigación CIPTEC, Facultad de Ingeniería, Fundación Universitaria Tecnológico Comfenalco, Cra. 44 No. 30A-91, Cartagena, Bolívar, Colombia.

^a Correo electrónico: mtorrenegra@sena.edu.co

^b Correo electrónico: nerlis.pajaro@unisucra.edu.co

^c Correo electrónico: gleon@tecnocomfenalco.edu.co

Recibido para evaluación: 28 de febrero de 2017

Aceptado para publicación: 24 de julio de 2017

RESUMEN

Se evaluó la actividad antibacteriana *in vitro* de aceites esenciales de diferentes especies del género *Citrus* frente a cepas ATCC de *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli*, determinando la concentración mínima inhibitoria (CMI) y la concentración mínima bactericida (CMB). Las bacterias se replicaron en medios de agar y caldos específicos. Se determinó el momento de máxima densidad óptica (DO_{620}) para emplearlo como tiempo de incubación; luego se hicieron pruebas de evaluación de sensibilidad con la exposición de las cepas a concentraciones a 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ del extracto en caldo. Para solubilizar se empleó dimetilsulfóxido (DMSO) al 1%. Posteriormente, se le determinó la concentración mínima inhibitoria mediante metodologías de microdilución en caldo y la concentración mínima bactericida. Encontrándose una actividad de los aceites esenciales del género *Citrus*, con valores de CMI $\geq 600 \text{ mg}/\text{mL}$ frente a *S. aureus*, *S. epidermidis*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* y *E. coli*. En función a los resultados obtenidos, se concluye que las diferentes especies del género *Citrus* son consideradas como promisorias para el control del componente bacteriano.

Palabras clave: actividad antibacteriana, *Citrus*, aceite esencial.

SUMMARY

Antibacterial activity *in vitro* of essential oils from different species of the genus *Citrus*

The *in vitro* antibacterial activity of essential oils of different species of the *Citrus* genus was evaluated against ATCC strains of *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli*, determining the minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC). The bacteria were replicated in specific agar media and broths. The maximum optical density moment (OD_{620}) was determined to be used as the incubation time; sensitivity tests were then performed with exposure of the strains at concentrations to 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ broth extract. 1% dimethylsulfoxide (DMSO) was used to solubilize. Subsequently, the minimum inhibitory concentration was determined using microdilution methodologies in broth and the minimum bactericidal concentration. We found strong activity of the essential oils of the genus *Citrus*, with values of CMI ≥ 600 mg/mL against *S. aureus*, *S. epidermidis*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* and *E. coli*. Based on the results obtained, it is concluded that the different species of *Citrus* genus are considered as promising for the control of the bacterial component.

Keywords: Antibacterial activity, *Citrus*, essential oil.

INTRODUCCIÓN

Colombia es un país que posee una gran diversidad de ecosistemas y microclimas, lo cual hace que su vegetación sea muy variada, enriquecida con especies endémicas y diversidad genética muy alta. Algunas de las plantas que se pueden encontrar poseen aceites esenciales con principios activos que han demostrado actividad biológica o industrial, con amplias perspectivas para llevar a cabo la investigación y el desarrollo de nuevos productos [1-4].

El término “aceite esencial” (AE) es utilizado para referirse a sustancias líquidas, volátiles, de carácter lipofílico y con propiedades aromáticas. Estas sustancias son sintetizadas por las plantas como metabolitos secundarios y pueden ser extraídas mediante métodos físicos como la destilación a vapor o hidrodestilación [5-7]. Los AE tienen un papel importante en la protección de las plantas, pues actúan como agentes antibacterianos, antivirales, antifúngicos e insecticidas [8-17]. Poseen una composición química

compleja que consiste en una mezcla de sustancias orgánicas como hidrocarburos, alcoholes, aldehídos, cetonas, ésteres, etc. [12, 18]. Algunos aceites esenciales se extraen de las células localizadas en el flavedo (parte externa coloreada de la cáscara) de los frutos cítricos [3, 12, 13, 19-24].

Los cítricos pertenecen a la clase Angiospermae, a la subclase dicotiledónea, a la orden rutae, a la familia rutaceae, cuyos frutos o frutas poseen un alto contenido en vitamina C y ácido cítrico y al género *Citrus*, y dentro de ellos se conocen las siguientes especies: naranja (*Citrus sinensis*), mandarina (*Citrus reticulata*), limón (*Citrus aurantifolia*), pomelo (*Citrus paradisi*) [12, 13, 14-19]. El origen del género *Citrus* se sitúa en el sureste de Asia y el centro de China, Filipinas y el archipiélago indomalayo hasta Nueva Guinea. Las primeras variedades e híbridos de cítricos son el resultado de un largo proceso de identificación, colecta y reproducción de plantas silvestres [19-24].

Los cítricos son cultivos permanentes y, en general, tienen alta adaptabilidad a diversas condiciones climáticas, facilitando su cultivo en un gran número de países, aunque las regiones productoras por excelencia han sido localizadas en el continente americano y en el occidente del continente europeo [3, 12, 13]. En especial, la naranja es la fruta más común del género *Citrus* spp., y la más conocida en el ámbito mundial [19-23].

El género *Citrus*, cuyo término común es cítrico, designa las especies de grandes arbustos o arbolillos perennes (entre 5 m y 15 m) de la familia de las rutáceas cuyos frutos poseen un alto contenido en vitamina C y ácido cítrico, el cual les proporciona ese sabor ácido tan característico [18, 25].

En este trabajo, se obtuvieron AE, mediante hidrodestilación (HD) e hidrodestilación asistida por la radiación con microondas (MWHd), de las especies vegetales naranja (*Citrus sinensis*), limón (*Citrus aurantifolia*), mandarina (*Citrus reticulata*), pomelo (*Citrus paradisi*), cultivadas en el norte del departamento de Bolívar (Colombia); y se determinó la composición química, la sensibilidad antibacteriana y la concentración mínima inhibitoria (CMI) *in vitro* de los AE frente a cepas ATCC de *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Los reactivos y otros materiales se adquirieron a entidades reconocidas. El dimetilsulfóxido (DMSO) se adquirió de JT Baker (Phillipsburg, EEUU). El Caldo Müller Hinton (caldo MH) y el agar Müller Hinton (agar MH), se obtuvieron de Merck KGaA (Darmstadt, Alemania). La gentamicina sulfato de Biopex SAC (Estándar Secundario

Lote: 10C256). Las cepas bacterianas provinieron de la American Type Culture Collection (ATCC): *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 13883), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) y *Escherichia coli* (ATCC 25922).

Recolección del material vegetal

El pericarpio de las frutas de naranja (*C. sinensis*), limón (*C. aurantifolia*), mandarina (*C. reticulata*), pomelo (*C. paradisi*) se recolectó en la ciudad de Cartagena, ubicada en el norte del departamento de Bolívar (10°25'25"N 75°31'31"O), Colombia.

Se tomaron 1000 g de pericarpio por semana, en el período comprendido de abril a mayo del 2016 bajo la supervisión del ingeniero agrónomo Antonio Carlos Bustillo, quien realizó la identificación taxonómica de la especie.

Procesamiento del material vegetal

El pericarpio de las frutas colectadas se lavó con agua desionizada, y se seleccionó las que se encontraban frescas, enteras, sin señales de deterioro. En seguida se trocearon, pesaron y procesaron inmediatamente [6].

Procedimientos de extracción del AE

La obtención del AE por HD, se efectuó en un equipo de hidrodestilación del tipo Clevenger 500 g del material vegetal, se introdujeron en el balón de extracción, el cual contenía 500 mL de agua destilada. El tiempo de extracción fue de 3 h.

Por el método MWHD, la obtención se llevó a cabo en un equipo de destilación tipo Clevenger con un reservorio de destilación Dean Stark adaptado a un sistema de calentamiento por radiación de microondas, un horno microondas convencional marca (Samsung, Estados Unidos), con una potencia del 70%, dentro del cual se colocó un balón de extracción de 4 L con 500 mL de agua destilada y 500 g del material vegetal. El tiempo de extracción fue de 3 h [4, 5].

En ambos casos, los aceites esenciales obtenidos se separaron por decantación e inmediatamente se almacenaron en viales ámbar a 4 °C hasta la realización de los respectivos análisis. Los rendimientos en la extracción se evaluaron por triplicado a tiempos de 20, 30, 40, 50, 60, 90, 120 y 180 min, operando siempre bajo las mismas condiciones [4, 5, 26, 27], según la ecuación (1):

$$\% \text{ Rendimiento} = \left(W_{AE} / W_{MV} \right) * 100 \quad (1)$$

Donde, W_{AE} es el peso (g) obtenido del aceite esencial y W_{MV} corresponde al peso en gramos (g) del material vegetal fresco.

Análisis del AE por cromatografía de gases/espectrometría de masas (CG/EM)

Se empleó un equipo CG/EM 7890A/5975C Agilent (Estados Unidos) en interfase con un detector selectivo de masas HP5973 Network conectado en línea con un sistema HP-MS ChemStation y la base de datos NIST-2008. Las condiciones de operación fueron las siguientes: columna capilar HP-5MS (5% phenyl methyl silox, 30 m × 250 μm × 0,25 μm), temperatura inicial 45 °C, temperatura de la línea de transferencia de 280 °C y volumen de inyección 1,0 μL en modo *split* (20:1), con temperatura del inyector de 250 °C [5]. La detección de los compuestos se realizó por comparación del espectro de masas, en cada tiempo de retención, con los reportados en la base de datos NIST-2008 [4, 6].

Actividad antibacteriana *in vitro*

Los inóculos bacterianos se prepararon de acuerdo con las indicaciones establecidas por el Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (CLSI, por sus siglas en inglés) [28], se tomaron entre 3 y 4 colonias bien diferenciadas y morfológicamente similares de las bacterias previamente sembradas en placas de Petri con agar MH, luego aquellas se suspendieron en tubos de ensayo con caldo MH estéril, se incubaron a 35 ± 2 °C y se verificó constantemente la densidad óptica (DO) a 620 nm en lector de microplacas (Multiscan EX Thermo®), hasta que la suspensión bacteriana alcanzó una DO₆₂₀ entre 0,08 - 0,1 unidades, lo que equivale a 0,5 en la escala de McFarland (1 × 10⁸ UFC/mL), la cual fue diluida a fin de obtener una suspensión de trabajo de 5 × 10⁵ UFC/mL en los ensayos biológicos [29-33]. A fin de determinar la fase de crecimiento exponencial de las bacterias y, de manera consecuente, el tiempo de incubación de estas, se realizaron curvas de crecimiento de las cepas en estudio. Para ello, 0,1 mL del inóculo diluido se adicionó a 9,9 mL de caldo MH e incubado a 35 ± 2 °C y se verificó la DO₆₂₀ de la suspensión bacteriana en un lector de microplacas [33]. Se utilizó dimetilsulfóxido al 1% (DMSO) para disolver el extracto obtenido; este se emplea con frecuencia en estudios microbiológicos [9, 34, 35]. Posteriormente, el DMSO al 1% y el extracto disuelto se incubaron en placas de 96 pocillos a 35 ± 2 °C por el tiempo definido para cada bacteria en las curvas de crecimiento; transcurrido este tiempo, se determinó los porcentajes de viabilidad frente al blanco de máximo crecimiento (caldo con inóculo). Para la evaluación de la actividad antibacteriana, se prepararon soluciones concentradas de 1000 μg/mL de los aceites esenciales, según el criterio de autores que consideran como promisorios aquellos extractos vegetales que presenten valores de concentración mínima inhibitoria (CMI) inferior a 1000 μg/mL [10]. Esta solución se incubó con las suspensiones bacterianas durante el tiempo definido para cada bacteria en las curvas de crecimiento, a 35 ± 2 °C, utilizando gentamicina sulfato (0,016 mg/mL) como control positivo de actividad antibacteriana. Transcurrido este tiempo, las placas se

agitaron durante 5 min a 100 rpm, se determinó la DO_{620} en lector de microplacas y se estimó la viabilidad por comparación frente al blanco de máximo crecimiento.

Concentración mínima inhibitoria (CMI)

Se determinó la CMI de aquellos aceites esenciales que presentaron porcentajes de inhibición superiores al 90%, siguiendo lo establecido por el CLSI con algunas modificaciones. Brevemente, 50 μ L de las suspensiones de las cepas bacterianas en estudio se incubaron, por el período de tiempo definido para cada bacteria en las curvas de crecimiento bacteriano, a 35 ± 2 °C, en placas de 96 pocillos, con 50 μ L de concentraciones seriadas entre 50 y 1000 μ g/mL del extracto evaluado. Las placas se sellaron durante el período de incubación para reducir la evaporación; al finalizar este tiempo, se agitaron a 100 rpm durante 5 min y se determinó la DO_{620} en lector de microplacas. La CMI se calculó como la mínima concentración del extracto o fracción que inhibe completamente el crecimiento bacteriano y se expresó en μ g/mL [29-32].

Concentración mínima bactericida (CMB)

Para determinar la concentración del aceite esencial que mostró completa inhibición del crecimiento bacteriano, en el ensayo de determinación de la CMI, se tomó un inóculo con un asa estéril y se hizo un subcultivo en placas de Petri con agar MH. Las placas inoculadas se incubaron a 35 ± 2 °C durante el tiempo adecuado para cada bacteria, luego del cual se evaluó si había crecimiento de colonias bacterianas. La CMB se calculó como la mínima concentración del compuesto que no permite el crecimiento visible de colonias en la placa de Petri. En caso de observarse crecimiento, se concluye que esa concentración del extracto o fracción produce un efecto bacteriostático [11].

Análisis estadístico

Los resultados correspondientes a tres ensayos independientes se expresaron como el promedio \pm el error estándar de la media (ESM). Para la organización de los datos se empleó la hoja de cálculo MS Excel 2010, y para los análisis estadísticos el paquete GraphPad Prism V5.00 para Windows.

RESULTADOS

La eficiencia de la extracción de los aceites esenciales de *C. sinensis*, *C. aurantifolia*, *C. reticulata*, *C. paradisi* se presenta en la figura 1.

La identificación de los componentes, los tiempos de retención y los porcentajes de abundancia son reportados en la tabla 1. Los monoterpenos son los metabolitos volátiles

con mayor abundancia en los AE. El compuesto mayoritario encontrado es el limoneno para ambos métodos “HD y MWHD” en todas las muestras evaluadas.

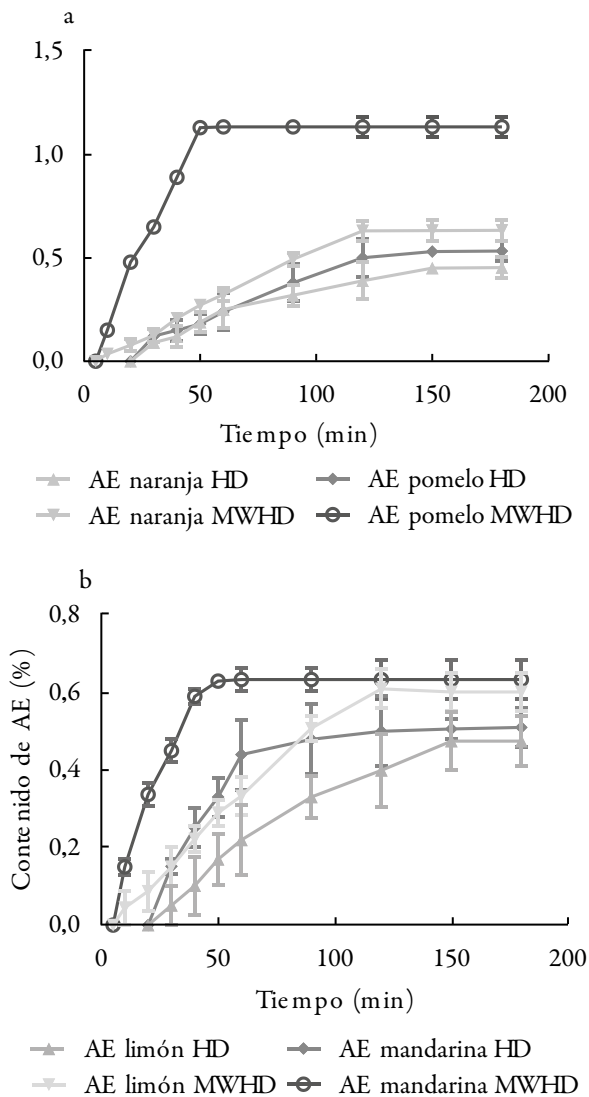


Figura 1. Cinética de extracción de los a) AE de *C. sinensis* y *C. paradisi*; b) *C. aurantifolia*, *C. reticulata*, obtenidos por el método de hidrodestilación por arrastre de vapor (HD) e hidrodestilación asistida por microondas (MWHD).

Tabla 1. Componentes mayoritarios detectados en los AE obtenidos por el método de hidrodestilación por arrastre de vapor (HD) e hidrodestilación asistida por microondas (MWHD).

Compuesto	Porcentaje de abundancia relativa (t^R , min)*							
	<i>C. sinensis</i>		<i>C. aurantifolia</i>		<i>C. reticulata</i>		<i>C. paradisi</i>	
	HD	MWHD	HD	MWHD	HD	MWHD	HD	MWHD
α -pineno	0,38 (9,89)**	0,59 (9,90)	1,68 (9,09)	1,77 (9,00)	0,70 (9,91)	0,90 (9,91)	0,45 (9,98)	0,65 (9,88)
β -mirreno	1,17 (12,01)	1,39 (12,45)	1,00 (12,01)	1,09 (12,45)	0,90 (12,10)	1,00 (12,05)	6,11 (11,89)	6,25 (11,99)
Limoneno	88,80 (13,05)	90,20 (13,01)	69,28 (13,36)	78,80 (13,61)	92,22 (13,34)	93,55 (13,55)	72,11 (12,90)	75,22 (12,91)
Linalool	0,60 (15,09)	0,89 (15,66)	14,60 (18,14)	17,89 (18,09)	3,03 (14,79)	3,89 (14,88)	0,54 (15,90)	0,66 (16,09)

* Tiempo de retención (t_R) y abundancia relativa (%) de los aceites esenciales, identificados por comparación con espectro de masas de referencia de la base de datos NIST - 2008. ** Todos los resultados presentaron diferencias estadísticas significativas a un nivel de confianza ($P < 0,05$).

Los ensayos de crecimiento revelaron que las cepas de *S. aureus*, *S. epidermidis*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* y *E. coli* alcanzaron la mayor DO_{620} a las 20 h; por tanto, estos fueron los tiempos de punto final de incubación en los bioensayos de actividad antibacteriana. Para disolver los aceites esenciales evaluados en DMSO al 1%, primero se evaluó el crecimiento bacteriano y se demostró que este disolvente no inhibió la viabilidad de ninguna de las cepas; por consiguiente, se eligió utilizar un sistema caldo: DMSO en proporción 99:1. Los resultados de la evaluación de la sensibilidad antibacteriana de los aceites esenciales de *C. sinensis*, *C. paradisi*, *C. aurantifolia* y *C. reticulata* obtenidos por el método de hidrodestilación por arrastre de vapor (HD) e hidrodestilación asistida por microondas (MWHD) (tabla 1), permitieron identificar los extractos capaces de inhibir el crecimiento de las cepas bacterianas, tomando como criterio de selección, aquellos que fueron capaces de inhibir en más de 90% a las tres cepas (tabla 2). Por tanto, se le determinó la CMI y CMB.

La CMI se determina con la utilización de caldo inoculado y estandarizado, al que se le adicionan soluciones del aceite esencial a diferentes concentraciones, provocando una dilución. Los valores se presentan en la tabla 3.

Por su parte, los resultados de la CMB para los aceites esenciales sugieren que a esas concentraciones su actividad se debe a efectos de tipo bacteriostático y no bactericida (tabla 3).

Tabla 2. Sensibilidad antibacteriana de los aceites esenciales de *C. sinensis*, *C. paradisi*, *C. aurantifolia* y *C. reticulata* obtenidos por el método de hidrodestilación por arrastre de vapor (HD) e hidrodestilación asistida por microondas (MWHD).

Muestras	Porcentaje de inhibición del crecimiento bacteriano				
	<i>S. aureus</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E. coli</i>
<i>C. sinensis</i> HD*	90,50 ± 0,25	90,00 ± 1,00	92,50 ± 0,33	92,98 ± 0,25	92,30 ± 0,15
<i>C. sinensis</i> MWHD*	90,90 ± 0,50	91,03 ± 0,30	93,00 ± 0,22	93,55 ± 0,66	92,80 ± 0,11
<i>C. paradisi</i> HD*	90,50 ± 0,52	90,50 ± 1,00	92,50 ± 0,33	91,98 ± 0,25	92,00 ± 0,15
<i>C. paradisi</i> MWHD*	91,00 ± 0,33	90,33 ± 0,11	92,80 ± 0,22	92,00 ± 0,66	92,78 ± 0,11
<i>C. aurantifolia</i> HD*	90,10 ± 0,89	90,23 ± 0,05	91,09 ± 0,78	91,07 ± 0,78	90,99 ± 0,50
<i>C. aurantifolia</i> MWHD*	90,99 ± 0,25	90,47 ± 0,33	92,4 ± 0,55	92,98 ± 0,33	92,17 ± 0,67
<i>C. reticulata</i> HD*	90,80 ± 0,50	90,57 ± 1,11	92,08 ± 0,15	92,00 ± 0,22	91,90 ± 0,70
<i>C. reticulata</i> MWHD*	91,00 ± 0,33	91,00 ± 0,25	92,50 ± 0,11	93,10 ± 0,10	92,22 ± 0,35
Gentamicina (control)	98,10 ± 0,33	98,00 ± 0,50	97,00 ± 0,55	98,00 ± 0,25	98,00 ± 0,33

*Aceites esenciales que inhibieron más de 90% a las cinco cepas. Los valores corresponden a la media de tres ensayos independientes ± desviación estándar.

Tabla 3. Concentración mínima inhibitoria (CMI) y concentración mínima bactericida (CMB) de aceites esenciales frente a *S. aureus*, *S. epidermidis*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* y *E. coli*.

Cepas bacterianas	Aceite esencial	Método de extracción	CMI($\mu\text{g}/\text{mL}$)	CMB($\mu\text{g}/\text{mL}$)
<i>S. aureus</i>	<i>C. sinensis</i>	HD	900	> 1000
		MWHD	900	> 1000
	<i>C. paradisi</i>	HD	1000	> 1000
		MWHD	1000	> 1000
	<i>C. aurantifolia</i>	HD	1000	> 1000
		MWHD	1000	> 1000
	<i>C. reticulata</i>	HD	900	> 1000
		MWHD	900	> 1000

(Continúa)

Tabla 3. Concentración mínima inhibitoria (CMI) y concentración mínima bactericida (CMB) de aceites esenciales frente a *S. aureus*, *S. epidermidis*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* y *E. coli* (continuación).

Cepas bacterianas	Aceite esencial	Método de extracción	CMI($\mu\text{g/mL}$)	CMB($\mu\text{g/mL}$)
<i>S. epidermidis</i>	<i>C. sinensis</i>	HD	1000	> 1000
		MWHD	900	> 1000
	<i>C. paradisi</i>	HD	1000	> 1000
		MWHD	1000	> 1000
	<i>C. aurantifolia</i>	HD	1000	> 1000
		MWHD	1000	> 1000
<i>C. reticulata</i>	HD	900	> 1000	
	MWHD	900	> 1000	
<i>K. pneumoniae</i>	<i>C. sinensis</i>	HD	700	> 1000
		MWHD	600	> 1000
	<i>C. paradisi</i>	HD	800	> 1000
		MWHD	700	> 1000
	<i>C. aurantifolia</i>	HD	900	> 1000
		MWHD	800	> 1000
<i>C. reticulata</i>	HD	800	> 1000	
	MWHD	600	> 1000	
<i>P. aeruginosa</i>	<i>C. sinensis</i>	HD	800	> 1000
		MWHD	600	> 1000
	<i>C. paradisi</i>	HD	900	> 1000
		MWHD	800	> 1000
	<i>C. aurantifolia</i>	HD	900	> 1000
		MWHD	800	> 1000
<i>C. reticulata</i>	HD	800	> 1000	
	MWHD	700	> 1000	
<i>E. coli</i>	<i>C. sinensis</i>	HD	700	> 1000
		MWHD	600	> 1000
	<i>C. paradisi</i>	HD	900	> 1000
		MWHD	800	> 1000
	<i>C. aurantifolia</i>	HD	900	> 1000
		MWHD	800	> 1000
<i>C. reticulata</i>	HD	700	> 1000	
	MWHD	600	> 1000	

DISCUSIÓN

Las plantas aromáticas son fuente de aceites esenciales, productos de alto valor agregado, empleados diariamente como aditivos alimenticios y fragancias, entre otros [2-5]. El uso de estas plantas, a lo largo de la historia, ha conducido a la búsqueda de métodos de extracción de aceites esenciales que ofrezcan ventajas tanto en la eficiencia de extracción como en la calidad del aceite obtenido [6, 8-11]. Teniendo en cuenta que la composición química está influenciada por diversos factores, como la temperatura, altitud, condiciones de cultivo, suelo origen y edad de la planta, así como por cambios de tipo genético [6].

Los rendimientos de AE más altos se alcanzaron en las especies de pomelo y mandarina caracterizado por el alto contenido de limoneno. Se encontraron diferencias estadísticas significativas para el rendimiento según el método de extracción empleado. Estos resultados indican que la técnica MWHD mostró ser el método más efectivo en la extracción de los aceites esenciales [36, 37]. Esto es debido a la acción de las microondas sobre las paredes glandulares que contiene el aceite esencial, lo cual hace que el material vegetal se rompa más rápido y eficientemente [26]. La hidrodestilación asistida por microondas utiliza tres formas de transferencia de calor dentro de la muestra: la irradiación, conducción y convección. Como resultado, produce calor con mayor rapidez dentro y fuera de las glándulas. Con la HD esta transferencia de calor solo puede ocurrir por conducción y convección, lo que la hace menos efectiva [6, 37].

De igual manera, la técnica de MWHD presenta ventajas destacables en comparación con HD en cuanto a disminución de tiempo y uso de solvente (agua), calentamiento efectivo y tamaño de equipo reducido. Sin embargo, la HD es un método sencillo, reproducible, económico y, sobre todo, ampliamente utilizado en la industria [6, 26, 27, 36, 37].

En los aceites estudiados, la fracción monoterpénica es la más abundante. El limoneno es el monoterpeno presente en mayor proporción (72,11% y 93,55%, abundancia relativa, tabla 1). El AE de *C. reticulata* mostró un mayor porcentaje, seguido de *C. sinensis* y *C. paradisi*; estos resultados son comparables con los reportados entre 76% y 96% para los AE cítricos [19-24]. Entre los monoterpenos detectados en mayor proporción que le siguen al limoneno son el β -mirceno y el linalool, los cuales se encuentran dentro de lo reportado por la literatura para aceites esenciales de cítricos [22].

Cabe resaltar que los aceites esenciales mostraron un mayor efecto inhibitorio frente a cepas Gram-negativas. Este comportamiento particular frente a un grupo de cepas, probablemente se debe a que la pared celular de las bacterias Gram-positivas estudiadas

está compuesta básicamente por peptidoglicano que representa hasta el 90% de la pared, ácidos teicoicos que también suelen estar presentes en pequeñas cantidades y polisacáridos; mientras que la pared celular de las Gram-negativas está constituida solo por el 10% del peptidoglicano, además posee tres polímeros que se encuentran fuera de su envoltura: lipoproteína, membrana externa y lipopolisacáridos, este último con un contenido de lípido A que pudiera favorecer la entrada, por disolución de los aceites esenciales debido a su carácter hidrofóbico y provocar la muerte celular por desestabilización de la membrana externa y la membrana plasmática. Este lípido A no está presente en las bacterias Gram-positivas y esta sería una causa probable del efecto del aceite en los diferentes grupos bacterianos, donde las bacterias Gram-negativas son relativamente más sensibles [22]. El carácter hidrofóbico de los AE le permite atravesar la pared celular de bacterias Gram-negativas a través de canales compuestos por unas proteínas llamadas porinas, las cuales se encuentran en la membrana externa y facilitan el transporte de nutrientes y sustancias de bajo peso molecular dentro de la célula, incluyendo agentes antimicrobianos [12, 19, 22].

Los componentes de los aceites esenciales podrían ejercer actividad antibacteriana por interferir en la bicapa de fosfolípidos de la membrana celular causando el incremento de su permeabilidad y pérdida de los constituyentes celulares, dado que destruye el sistema de enzimas incluyendo las que implican la producción de energía celular (fuerza motriz de protones) y de respiración bacteriana, cuando se trata de concentraciones bajas de los aceites esenciales; mientras que a altas concentraciones provocarían daños severos de los componentes estructurales de la célula bacteriana, como la pérdida de homeóstasis o inactivando o destruyendo el material genético, dando lugar a la muerte celular. En el mecanismo de acción de los aceites esenciales como agentes antibacterianos, se debe considerar el gran número de compuestos químicos que se encuentran presentes en estos, cuyas actividades antibacterianas no presentan un mecanismo específico [12, 19, 22].

En función a los resultados obtenidos, concluimos que las diferentes especies del género *Citrus* son consideradas como promisorias para el control del componente bacteriano. El rendimiento de los aceites esenciales es dependiente del método de extracción utilizado para su obtención. Desde el punto de vista de la química, los aceites esenciales contienen mayoritariamente monoterpenos, siendo el limoneno el que se encuentra con un mayor porcentaje de abundancia relativa. Se destaca que el proceso de hidrodestilación asistida por radiación con microondas es considerado un método rápido, eficiente, verde y relativamente económico en comparación con la hidrodestilación convencional.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a la Universidad de Cartagena y al Centro de Comercio y Servicios, Sena, por facilitar el espacio, los recursos y el tiempo; asimismo, al ingeniero agrónomo Antonio Carlos Bustillo por su colaboración.

CONFLICTO DE INTERESES

Los autores no declaran conflicto de intereses.

REFERENCIAS

1. M. Andrade, Estado del conocimiento de la biodiversidad en Colombia y sus amenazas. Consideraciones para fortalecer la interacción ciencia-política, *Rev. Acad. Colomb. Cienc.*, **35** (137), 491-507 (2011).
2. C. Granados, Y. Yáñez, G. Santafé, Evaluación de la actividad antioxidante del aceite esencial foliar de *Calycolpus moritzianus* y *Minthostachys mollis* de Norte de Santander, *Bistua, Rev. Fac. Cienc. Bás.*, **10** (1), 12-23 (2012).
3. G. Matiz, M.R. Osorio, F. Camacho, M. Atencia, J. Herazo, Diseño y evaluación *in vivo* de fórmulas para acné basadas en aceites esenciales de naranja (*Citrus sinensis*), albahaca (*Ocimum basilicum* L.) y ácido acético, *Biomédica, Rev. Inst. Nac. Salud*, **32** (1), 125-133 (2012).
4. G. León, M. Torrenegra, M. Osorio, J. Gil, Extracción, caracterización y actividad antioxidante del aceite esencial de *Plectranthus amboinicus* L., *Rev. Cubana Farm.*, **49** (4), 708-718 (2015).
5. M. Torrenegra, C. Granados, M. Osorio, G. León, Method comparison of hydrodistillation microwave radiation-assisted (MWHHD) front hydrodistillation (HD) in the extraction of essential oil of *Minthostachys mollis*, *Inf. Tecnol.*, **26** (1), 117-122 (2015).
6. G. León, M.R. Osorio, S.R. Martínez, Comparación de dos métodos de extracción del aceite esencial de *Citrus Sinensis* L., *Rev. Cubana Farm.*, **49** (4), 742-750 (2015).
7. G. Mohammad-Taghi, R. Karamatollah, Comparison of microwave-assisted hydrodistillation with the traditional hydrodistillation method in the extraction of essential oils from *Thymus vulgaris* L., *Food Chem.*, **109** (4), 925-930 (2008).

8. L. Hernández, M. Rodríguez, Actividad antimicrobiana de plantas que crecen en Cuba, *Rev. Cubana Plant. Med.*, **6** (2), 44-47 (2001).
9. A. Ramírez, L. Stella, D. Marín, Metodologías para evaluar *in vitro* la actividad antibacteriana de compuestos de origen vegetal, *Scientia et Technica*, **15** (42), 263-268 (2009).
10. S. Gibbons, Plants as a source of bacterial resistance modulators and anti-infective agents, *Phytochem. Rev.*, **4** (1), 63-78 (2005).
11. L. Franco, G. Matiz, I. Pájaro, H. Gómez, Actividad antibacteriana in vitro de extractos y fracciones de *Physalis peruviana* L. y *Caesalpinia pulcherrima* (L.) Swartz, *Boletín Latinoamer. Caribe Plant. Med. Aromát.*, **12** (3), 230-237 (2013).
12. J. Martínez, B. Sulbarán, G. Ojeda, A. Ferrer, R. Nava, Actividad antibacteriana del aceite esencial de mandarina, *Rev. Fac. Agronom. Univ. Zulia*, **20**, 502-512 (2003).
13. M. Torrenegra-Alarcón, C. Granados-Conde, M. Durán-Lengua, G. León-Méndez, X. Yáñez-Rueda, N. Pájaro-Castro, Composición química y actividad antibacteriana del aceite esencial de *Minthostachys mollis*, *ORINOQUIA - Universidad de los Llanos*, **20** (1), 69-74 (2016).
14. F. Bakkali, S. Averbeck, D. Averbeck, M. Idaomar, Biological effects of essential oils – A review, *Food Chem. Toxicol.*, **42** (2), 446-475 (2008).
15. K. Chaieb, H. Hajlaoui, T. Zmantar, A. Kahla-Nakbi, M. Rouabhia, K. Mahdoui, A. Bakhrouf, The chemical composition and biological activity of clove essential oil, *Eugenia caryophyllata* (*Syzygium aromaticum* L. Myrtaceae): A short review, *Phytother. Res.*, **21** (6), 501-506 (2007).
16. K. Saban, C. Ahmet, O. Hakan, C. Ramazan, K. Memis, M. Ebru, Antifungal, phytotoxic and insecticidal properties of essential oil isolated from Turkish and its three components, carvacrol, thymol and cymene, *Bioresource Technol.*, **99** (18), 8788-8795 (2008).
17. M. Ramy, S. Romeilah, I. Ghada, Chemical compositions, antiviral and antioxidant activities of seven essential oils, *J. Appl. Sci. Res.*, **6** (1), 50-62 (2010).
18. B. Sulbarán, G. Ojeda, F. Ysambertt, L. Cabrera, Volatile fraction composition of Venezuelan sweet orange essential oil (*Citrus sinensis*), *Ciencia*, **11** (1), 55-60 (2003).

19. J.R. Juárez, A.J. Castro, J.F. Jáuregui, J.V. Lizano, M. Carhuapoma, F.F. Choquesillo *et al.*, Composición química, actividad antibacteriana del aceite esencial de *Citrus sinensis* L. (naranja dulce) y formulación de una forma farmacéutica, *Cienc. Inv.*, **13** (1), 9-13 (2010).
20. M.L. Lota, D. de Rocca-Serra, C. Jacquemond, F. Tomi, J. Casanova, Chemical variability of peel and leaf essential oils of sour orange, *Flav. Frag. J.*, **16**, 89-96 (2001).
21. X. Yáñez, L.L. Lugo, D.Y. Parada, Estudio del aceite esencial de la cáscara de la naranja dulce (*Citrus sinensis*, variedad valenciana) cultivada en Labateca (Norte de Santander, Colombia), *Bistua, Rev. Fac. Cienc. Bás.*, **5** (1), 3-8 (2007).
22. L. Guerra, L. Soto, Z. Medina, G. Ojeda de R., J. Peña. Actividad antibacteriana del aceite esencial de cortezas de naranja (*Citrus sinensis*) var. Valencia frente a microorganismos Gram-positivos y Gram-negativos, *Rev. Fac. Agronom. Univ. Zulia*, **31**, 215-232 (2014).
23. J.P. Rojas, A. Perea, E.E. Stashenko, Obtención de aceites esenciales y pectinas a partir de subproductos de jugos cítricos, *Vitae, Rev. Fac. Quím. Farm., U. de A.*, **16** (1), 110-115 (2009).
24. L. Soto, G. Ojeda de Rodríguez, L. Rojas, B. Sulbarán, J. Peña, M. Berradre, V. Fernández, Caracterización química del aceite esencial de toronja (*Citrus paradisi* L.), *Rev. Fac. Agronom. Univ. Zulia*, **30**, 266-283 (2013).
25. M. Viuda, Y. Ruiz, J. Fernández, J. Pérez, Antibacterial activity of lemon (*Citrus lemon* L.), mandarin (*Citrus reticulata* L.), grapefruit (*Citrus paradise* L.) and orange (*Citrus sinensis* L.) essential oils, *J. Food Safety*, **28** (4), 567-576 (2008).
26. M. Golmakani, K. Rezaei, Comparison of microwave-assisted hydrodistillation with the traditional hydrodistillation method in the extraction of essential oils from *Thymus vulgaris* L., *Food Chem.*, **109** (4), 925-930 (2008).
27. H.W. Wang, Y.Q. Liu, S.L. Wei, Z.J. Yan, K. Lu, Comparison of microwave-assisted and conventional hydrodistillation in the extraction of essential oils from mango (*Mangifera indica* L.) Flowers, *Molecules*, **15**, 7715-7723 (2010).
28. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), "Performance standards for antimicrobial susceptibility testing", 21st international supplements, CLSI Document M100-S21, Wayne, Pennsylvania, 2011.

29. G. Matiz, M. Osorio, G. León, Actividad antibacteriana *in vitro* de diecinueve aceites esenciales frente a bacterias asociadas al acné, *Rev. Cubana Farm.*, **49** (1), 103-116 (2015).
30. M. Torrenegra, G. Matiz, G. León, J. Gil, Actividad antibacteriana *in vitro* de aceites esenciales frente a microorganismos implicados en el acné, *Rev. Cubana Farm.*, **49** (3), 512-523 (2015).
31. G. Matiz, M. Osorio, Actividad antibacteriana de extractos de hormigas de los géneros *Crematogaster* y *Solenopsis*, *Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm.*, **42** (1), 42-55 (2013).
32. G.E. Matiz-Melo, K.F. Fuentes-López, G. León-Méndez, Microencapsulación de aceite esencial de tomillo (*Thymus vulgaris*) en matrices poliméricas de almidón de ñame (*Dioscorea rotundata*) modificado, *Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm.*, **44** (2), 189-207 (2015).
33. J.E. Pérez, G. Isaza, S. Acosta, Actividad antibacteriana de extractos de *Phenax rugosus* y *Tabebuia chrysantha*, *Biosalud*, **6**, 59-68 (2007).
34. S. Sutton, Measurement of cell concentration in suspension by optical density, *Pharm. Microbiol. Forum Newsletter*, **12** (8), 3-13 (2006).
35. A. López, A. García, J. Rojas, Evaluación de dos metodologías para determinar la actividad antimicrobiana de plantas medicinales, *Boletín Latinoamer. Caribe Plant. Med. Aromát.*, **4** (2), 28-32 (2005).
36. H.W. Wang, Y.Q. Liu, S.L. Wei, Z.J. Yan, X. Jin, Comparative chemical composition of the essential oils obtained by microwave-assisted hydrodistillation and hydrodistillation from *Agrimonia pilosa Ledeb.* Collected in three different regions of China, *Chem. Biodivers.*, **9** (3), 662-668 (2012).
37. C.A. Rincón, J.C. Castaño, E. Ríos, Actividad biológica de los aceites esenciales de *Acmella ciliata* (Kunth) Cass., *Rev. Cubana Plant. Med.*, **17** (2), 160 (2012)

CÓMO CITAR ESTE ARTÍCULO

M.E. Torrenegra-Alarcón, N.P. Pájaro, G. León-Méndez, Actividad antibacteriana *in vitro* de aceites esenciales de diferentes especies del género *Citrus*, *Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm.*, **46** (2), 160-175 (2017).

Evaluación de la acción antiséptica de un jabón líquido utilizando algunos aceites esenciales como agente activo

María del Rosario Osorio Fortich^{1a}, Germán Eduardo Matiz Melo^{2d}, Glicerio León Méndez^{1b}, Darley López Olivares^{1c}, Nerlis Paola Pájaro^{3e}

¹ Grupo de Investigación en Tecnología Farmacéutica, Cosmética y de Alimentos (Gitfca), Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Universidad de Cartagena, Cartagena, Colombia.

² Grupo de Investigación en Tecnología de Productos Naturales (Tecprona), Departamento de Farmacia, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá, Cra. 30 No. 45-03, Colombia.

³ Grupo de Ciencias Médicas y Farmacéuticas, Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad de Sucre, Sincelejo, Colombia.

^a Correo electrónico: mosoriof@unicartagena.edu.co

^b Correo electrónico: gleonm1@unicartagena.edu.co

^c Correo electrónico: dlopezo1@unicartagena.edu.co

^d Correo electrónico: gematizm@unal.edu.co

^e Correo electrónico: nerlis.pajaro@unisucra.edu.co

Recibido para evaluación: 16 de febrero de 2017

Aceptado para publicación: 31 de julio de 2017

RESUMEN

Se evaluó la acción antiséptica de un jabón líquido utilizando como activo aceites esenciales de *Eugenia caryophyllata* T. (clavo de olor) y *Cinnamomum verum* J. (canela). Se formularon y elaboraron jabones líquidos usando como activo aceites esenciales a concentraciones de 1,5% y 2%, posteriormente se evaluaron parámetros fisicoquímicos, sensoriales, así como también microbiológicos sobre cepas bacterianas de *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Se encontró que las formulaciones idóneas son aquellas en las que los aceites esenciales de clavo y canela se encuentran a concentraciones del 2%, puesto que presentan actividad contra las cepas bacterianas en cuestión y mejor estabilidad fisicoquímica; siendo elegido entre los evaluadores de las propiedades organolépticas el jabón líquido preparado con aceite esencial de canela como el favorito con respecto al de clavo, por presentar

mejor aroma y aspecto. Se concluye que los jabones líquidos antisépticos a partir de 2% de aceite esencial de *Eugenia caryophyllata* T. y *Cinnamomum verum* J. presentaron resultados promisorios; igualmente, todos los indicadores fisicoquímicos y químicos evaluados se mantuvieron, lo que nos brinda un indicio de la correcta formulación desde el punto de vista galénico.

Palabras clave: clavo de olor, canela, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*.

SUMMARY

Evaluation of the action antiseptic of a liquid soap using some oils essential as an active agent

The antiseptic action of a liquid soap was evaluated using as essential oils of *Eugenia caryophyllata* T. (clove) and *Cinnamomum verum* J. (cinnamon). Is formulated and produced soaps liquids using as active oils essential to concentrations of 1.5% and 2%, subsequently is evaluated parameters physicochemical, sensory, as well as also microbiological on strains bacterial of *Escherichia coli* ATCC 25922 and *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Finding is that the formulations suitable are those in which them oils essential of clove and cinnamon is found to concentrations of the 2%, since present activity against them strains bacterial in question and best stability physicochemical; being chosen among the evaluators of the organoleptic properties liquid soap prepared with essential oil of cinnamon as the favorite on the nail, by presenting better aroma and appearance. Concluding that the antiseptic liquid soaps from 2% of essential oil of *Eugenia caryophyllata* T. and *Cinnamomum verum* J. presented promising results; also, all the indicators physicochemical and chemical evaluated were kept, which gives us an indication of the correct formulation from the pharmaceutical point of view.

Keywords: Clove, cinnamon, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*.

INTRODUCCIÓN

La carga microbiana en las manos aumenta progresivamente durante las diferentes actividades cotidianas, de ahí que la higiene de las manos constituya un factor importante en la reducción de patologías asociadas y contaminación cruzada [1-3]. Durante los últimos años se han llevado a cabo campañas a nivel mundial con el fin de incentivar

el lavado de las manos para así tener una mejor calidad de vida, por lo cual, de manera paralela al lavado, se han venido usando productos para la higienización de las manos, que ofrecen una rápida reducción de la carga bacteriana [3]. Sin embargo, la comunidad científica afirma que el uso constante de jabón antibacterial podría convertirse en una práctica peligrosa, debido a que las bacterias a largo plazo desarrollan resistencia a los activos bactericidas [4-6].

La resistencia bacteriana es un fenómeno creciente caracterizado por una refractariedad parcial o total de los microorganismos al efecto del antibiótico generado, principalmente, por el uso indiscriminado e irracional de estos y no solo por la presión evolutiva que se ejerce en el uso terapéutico [1-8].

La Administración de Medicamentos y Alimentos de Estados Unidos (FDA, por su sigla en inglés) en el 2016, suspendió el uso de 19 ingredientes químicos, entre los que se encuentran el triclosán y el triclocarbán, debido a que la industria aún no ha podido demostrar que su uso a largo plazo sea seguro, ni más eficaz que el jabón tradicional y el agua para la prevención y la propagación de ciertas enfermedades. En este contexto, diversos investigadores demostraron que el uso repetitivo de estas sustancias podría crear resistencia bacteriana, así como alteraciones en la glándula tiroides o el sistema reproductivo, e incluso influir en el crecimiento de recién nacidos y animales expuestos a estos componentes [7, 9].

En este contexto, existe un gran interés en sustancias de origen natural con potencial actividad bactericida o bacteriostática, por lo cual en los últimos años han sido objeto de estudio muchas fuentes de origen vegetal [10-14].

Considerando lo anteriormente expuesto, se evaluó la acción antiséptica de un jabón líquido utilizando como agente activo aceites esenciales.

MATERIALES Y MÉTODOS

Diseño de formulación tipo jabón líquido de acción antiséptica

Se diseñó y se elaboró un jabón líquido al que se le incorporaron unas concentraciones de 1,5% y 2% de aceites esenciales (AE) de *Eugenia caryophyllata* T. y *Cinnamomum verum* J., que en estudios previos demostró potente actividad antibacteriana [10, 14-18].

Estudio de preformulación

Se realizó un estudio de preformulación para determinar que no existieran incompatibilidades entre el principio activo y los auxiliares de formulación, que afectaran la estabili-

dad del producto final; por consiguiente, se revisaron las fichas técnicas de cada materia prima, para verificar las posibles interacciones que existieran entre los componentes y así encontrar la mejor composición para el jabón líquido [10, 14-18].

Formulación del jabón líquido

Luego de encontrar los componentes para la formulación del jabón líquido (tabla 1) y teniendo en cuenta los rangos de dosificación que se encuentran en las fichas técnicas de cada componente, se realizan pruebas de laboratorio, elaborando cada vez 100 g de producto [14].

Tabla 1. Formulación de los jabones antisépticos a partir de aceites esenciales.

Componentes	Porcentaje
Lauril éter sulfato de sodio al 28%	50%
Cocobetaina	5%
Glicerina	5%
Polyquaternium 39®	1,5%
Polyquaternium 6®	1,5%
Aceite esencial	1,5-2%
Cloruro de sodio	1,5%
Agua purificada	c.s.p. 100%*

* c.s.p.: cantidad suficiente para 100%

Controles a la formulación

Para determinar las especificaciones de calidad de la formulación se establecieron, por triplicado y a tres muestras diferentes, elaboradas bajo las mismas condiciones, las características organolépticas como color, olor, así como sus características físicas y químicas como pH, viscosidad y composición química por cromatografía de gases/espectrómetro de masa (GC/MS); igualmente, se determinó la actividad antioxidante *in vitro* del producto terminado [14-20].

Determinación de pH: se tomaron 10 g del jabón líquido con agitación constante a una velocidad moderada por 5 min, a la cual se determinó el pH empleando un potenciómetro previamente calibrado con soluciones *buffer* de pH 4,0 y 7,0 [14, 21, 22].

Determinación de viscosidad: la viscosidad aparente del jabón líquido se midió a 25 °C en un viscosímetro Brookfield DV-E (Estados Unidos) con aguja No. 3 a 100 rpm hasta estabilizar la lectura [14, 21, 22].

Análisis de la formulación por cromatografía de gases/espectrometría de masas (GC/MS): se empleó un equipo GC/MS 7890A/5975C Agilent (Estados Unidos) en interfase con un detector selectivo de masas HP5973 Network conectado en línea con un sistema HP-MS ChemStation y la base de datos NIST-2008. Las condiciones de operación fueron las siguientes: columna capilar HP-5MS (5% phenyl methyl silox, 30 m × 250 μm × 0,25 μm), temperatura inicial 45 °C, temperatura de la línea de transferencia de 280 °C y volumen de inyección 1,0 μL en modo *split* (20:1), con temperatura del inyector de 250 °C [13-18]. La detección de los compuestos se realizó por comparación del espectro de masas con los reportados en la base de datos NIST-2008 [13, 14, 19, 20].

Actividad antibacteriana *in vitro*

La actividad antibacteriana del jabón líquido se hizo de la manera que se describe a continuación.

Cepas de *S. aureus* y *E. coli* se inocularon en caldo Tripticasa Soya (TSA), de acuerdo con las indicaciones establecidas por la CLSI [23], se tomaron entre 3 y 4 colonias bien diferenciadas y morfológicamente similares de las bacterias previamente sembradas en placas de Petri con agares homólogos; luego se incubaron a 35 ± 2 °C y se verificó sistemáticamente la densidad óptica a 620 nm (DO₆₂₀) en lector de microplacas (Multiscan EX Thermo®, USA), hasta que la suspensión bacteriana alcanzara una DO₆₂₀ entre 0,08 y 0,1 equivalente a 0,5 en la escala de McFarland (1 × 10⁸ UFC/mL) [24-30]. Una vez alcanzado este valor, 5 mL de caldo se mezclaron con 5 mL de jabón líquido empleando un agitador Vórtex, en tubos de ensayo microbiológico con tapa estériles, dejándose en incubación por 24 h a 35 ± 2 °C en agitación constante. Finalizado este tiempo, y para evaluar la capacidad bactericida del jabón líquido, asadas tomadas de los tubos se sembraron en agar TSA y nuevamente se incubaron a las mismas condiciones por 24 h [27].

Análisis estadístico

Los resultados correspondientes a tres ensayos independientes se expresaron como el promedio ± el error estándar de la media (ESM). Para la organización de los datos se empleó la hoja de cálculo MS Excel 2010, y para los análisis estadísticos el paquete GraphPad Prism V5.00 para Windows.

RESULTADOS

La composición final de la formulación se basó en la evaluación de las características farmacotécnicas (formación y estabilidad física del jabón líquido), hasta obtener productos con características apropiadas para su empleo. Estos se obtuvieron preparando una base de jabón líquido, a la cual se adicionó el AE (tabla 1). Después de la preparación, se determinaron las características organolépticas, físicas y químicas de la misma (tablas 2 y 3). Esta última se llevó a cabo por GC/MS para estimar la composición del AE.

Tabla 2. Propiedades fisicoquímicas de los jabones antisépticos.

Jabón líquido		Viscosidad (cP)	pH	Color	Olor
AE <i>C. verum</i>	1,5%	4626,66 ± 1,0	5,53 ± 0,05	Blanco	Característico del AE
	2%	3240 ± 0,50	5,44 ± 0,01	Blanco	Característico del AE
AE <i>E. caryophyllata</i>	1,5%	1070 ± 0,10	5,69 ± 0,20	Blanco	Característico del AE
	2%	1250 ± 0,25	5,75 ± 0,10	Blanco	Característico del AE
Blanco		2233,33 ± 0,50	5,79 ± 0,10	Blanco	Inoloro

Tabla 3. Componentes mayoritarios detectados en la sustancia activa.

Compuesto	Porcentaje de abundancia relativa (t_R , min)*	
	<i>C. verum</i>	<i>E. caryophyllata</i>
Linalool	2,13 (5,856)	--
Alcanfor	1,13 (6,501)	--
Mentol	3,39 (6,958)	--
Cinnamaldehído	89,25 (8,568)	--
Timol	3,40 (8,859)	--
Eugenol	--	65,24 (9,955)
Cariofileno	--	12,02 (11,296)
Eugenol acetato	--	5,08 (12,306)
Butilhidroxitolueno	--	10,36 (12,419)

* Tiempo de retención (t_R) y abundancia relativa (%) de los aceites esenciales, identificados por comparación con espectro de masas de referencia de la base de datos NIST-2008.

Para determinar si el AE mantiene su actividad antibacteriana al ser incorporado dentro del jabón líquido, se determinó la actividad antibacteriana *in vitro* del producto terminado, cuyos resultados se presentan en la tabla 4.

Tabla 4. Actividad antibacteriana *in vitro* del producto terminado.

Jabón líquido		UFC de <i>E. coli</i> *	UFC de <i>S. aureus</i> *
AE <i>C. verum</i>	1,5%	Colonias incontables	Colonias incontables
	2%	0 UFC/mL de jabón	0 UFC/mL de jabón
AE <i>E. caryophyllata</i>	1,5%	Colonias incontables	Colonias incontables
	2%	0 UFC/mL de jabón	0 UFC/mL de jabón
Blanco		Colonias incontables	Colonias incontables

* UFC: unidades formadoras de colonia.

DISCUSIÓN

La determinación de la actividad antiséptica de los extractos vegetales es un tema inagotable, pues a pesar de que esta es bien conocida desde tiempos primigenios, emplearlos de manera específica seleccionando una especie, ajustando una dosis, estabilizando una formulación basada en su composición, es una labor que no se puede realizar con información genérica [32].

Es importante tener presente que, en las preparaciones de aplicación en la piel, el pH debe estar comprendido entre 4,5-7,5 de modo que no se produzca irritación y daño a la piel. El pH de los jabones líquidos antisépticos se mantuvo en un rango de 5,4-5,8 el cual se encuentra dentro de los valores recomendados. Lo anterior garantiza que el jabón líquido no provoque irritación en el momento de su aplicación y, además, constituye un indicador de estabilidad física [14, 21, 22].

En el análisis reológico se registró un comportamiento característico de los jabones líquidos en todos, obteniendo valores comprendidos entre 1070 y 4626,66 cP, y se observó que el AE de clavo genera valores de viscosidad más bajos en el jabón líquido. Además, se determinó que las formulaciones corresponden a un fluido no newtoniano con tixotropía positiva. Las propiedades reológicas deben proporcionar al preparado una adecuada extensibilidad y adaptabilidad a la superficie y cavidades cutáneas [14, 33, 34].

El aceite esencial de *C. verum* presenta un alto contenido de monoterpenos; destacándose la presencia de cinnamaldehído, timol y mentol, mientras el AE de *E. caryophyllata* posee eugenol. Estos compuestos mayoritarios definen la actividad biológica de los aceites esenciales, donde no se puede enmarcar a uno solo como el responsable de la misma, lo que explica la actividad antibacteriana encontrada en el jabón líquido. Es interesante destacar que en este trabajo se logró identificar los compuestos mayoritarios eugenol,

mentol, timol y cinnamaldehído, lo que concuerda con lo reportado en la literatura [12, 24, 25, 35-37].

En particular, los AE presentaron la mayor concentración relativa de los compuestos como eugenol y timol, los cuales pueden penetrar la membrana del citoplasma, causando una desestabilización de esta; igualmente, podría actuar como intercambiador de protones, reduciendo el gradiente de pH a lo largo de la membrana o inhibiendo la producción de enzimas intracelulares, como amilasas y proteasas, lo que provoca el deterioro de la pared y un alto grado de lisis celular [12, 24, 25, 35-37].

Con estos resultados se sigue sumando evidencia que avalan a los aceites esenciales, como una buena fuente natural y disponible, para facilitar el desarrollo de diferentes preparaciones cosméticas, farmacéuticas o nutricionales con actividad biológica definida.

CONCLUSIONES

Los jabones líquidos antisépticos formulados a partir de 2% de AE de *Eugenia caryophyllata* T. y *Cinnamomum verum* J., presentaron indicadores fisicoquímicos, químicos y microbiológicos promisorios; lo que nos brinda un indicio de la correcta formulación desde el punto de vista galénico.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a la Universidad de Cartagena, la Universidad Nacional de Colombia y la Universidad de Sucre por facilitar espacios, recursos y tiempo de los investigadores, así como a las jóvenes investigadoras de la carrera de Química Farmacéutica: María Conchita Galvis y Francis Díaz.

CONFLICTO DE INTERESES

Los autores no declaran conflicto de intereses.

REFERENCIAS

1. V. Anaya, S. Ortiz, V. Hernández, A. García, M. Jiménez, U. Ángeles, Prevalencia de lavado de manos y factores asociados al incumplimiento. Estudio de sombra, *Rev. Enferm. Inst. Mex. Seguro Soc.*, **15**, 141-146 (2007).

2. U. Ángeles, F. Molinar, V. Anaya, M. López, Efectividad de la aplicación de alcohol gel en la higiene de las manos de enfermeras y médicos, *Rev. Enferm. Inst. Mex. Seguro Soc.*, **13**, 15-21 (2005).
3. K.E. Rodríguez-Merchán, J.G. Rueda-Buitrago, J. Arias, L. Hernández-Esquivel, “Evaluación de la efectividad en guantes del producto Clean Hand bajo condiciones de uso en laboratorio clínico del hospital de Suba ESE.”, Trabajo de grado, Facultad de Ciencias, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, D. C., 2009.
4. F. Barbut, E. Maury, L. Goldwirt, P. Boelle, D. Neyme, R. Aman, B. Rossi, G. Offenstadt, Comparison of the antibacterial efficacy and acceptability of an alcohol-based hand rinse with two alcohol-based hand gels during routine patient care, *J. Hosp. Infect.*, **66**, 167-173 (2007).
5. G. Kampf, State of the art hand hygiene in community medicine, *Int. J. Hyg. Environ. Health*, **2006**, 465-472 (2003).
6. G. Kampf, A. Kramer, Review: Epidemiologic background of hand hygiene and evaluation of the most important agents for scrubs and rubs, *Clin. Microbiol.*, **17**, 863-893 (2004).
7. US Food and Drug Administration, antibacterial soap? You can skip it Use plain soap and water, 2016.
8. M. Leung, K. Bishop, M. Monga, The effect of temperature on bactericidal properties of 10% povidone-iodine solution, *Am. J. Obst. Gynecol.*, **186**, 869-871 (2002).
9. US Food and Drug Administration, La FDA emite la regla definitiva sobre la seguridad y la eficacia de los jabones antibacterianos, 2016.
10. G. Matiz, M.R. Osorio, F. Camacho, M. Atencia, J. Herazo, Diseño y evaluación *in vivo* de fórmulas para acné basadas en aceites esenciales de naranja (*Citrus sinensis*), albahaca (*Ocimum basilicum L.*) y ácido acético, *Biomédica: Rev. Inst. Nal. Salud*, **32**, 125-133 (2012).
11. M. Torrenegra, C. Granados, M. Osorio, G. León, Method comparison of hydro-distillation microwave radiation-assisted (MWHHD) front hydrodistillation (HD) in the extraction of essential oil of *Minthostachys mollis*, *Inf. Tecnol.*, **26**, 117-122 (2015).

12. G. León, M. Torrenegra, M. Osorio, J. Gil, Extracción, caracterización y actividad antioxidante del aceite esencial de *Plectranthus amboinicus* L., *Rev. Cubana Farm.*, **49**, 708-718 (2015).
13. G. León, M.R. Osorio, S.R. Martínez, Comparación de dos métodos de extracción del aceite esencial de *Citrus Sinensis* L., *Rev. Cubana Farm.*, **49**, 742-750 (2015).
14. N.P. Pájaro-Castro, G. León-Méndez, M.R. Osorio-Fortich, M.E. Torrenegra-Alarcón, Y. García-Milano, Evaluación de indicadores físicos y químicos de una emulsión fluida con aceite esencial de *Plectranthus amboinicus* L., *Rev. Cubana Farm.*, **50** (3), (2016), disponible en <http://www.revfarmacia.sld.cu/index.php/far/article/view/43>.
15. J.R. Juárez, A.J. Castro, J.F. Jáuregui, J.V. Lizano, M. Carhuapoma, F.F. Choquesillo *et al.*, Composición química, actividad antibacteriana del aceite esencial de *Citrus sinensis* L. (naranja dulce) y formulación de una forma farmacéutica, *Cienc. Invest.*, **13**, 9-13 (2010).
16. G.E. Matiz, P.A. Cárdenas, J. Rincón, Estudios de preformulación de un fitomedicamento tópico antiinflamatorio con base en fracciones activas de flores y hojas de *Caesalpinia pulcherrima* (L.) Swartz empleando modelos analíticos biológicos, *Lat. Am. J. Pharm.*, **26**, 332-338 (2007).
17. I. Almirall, T. Fernández, H.M. González, M. Díaz, Diseño de una crema para masajes con extracto de spirulina cubana, *Rev. Cubana Farm.*, **39** (3), (2005), disponible en http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-75152005000300008.
18. V. Mujica, M. Delgado, M. Ramírez, I. Velásquez, C. Pérez, M. Rodríguez-Corella, Formulación de un producto cosmético con propiedades antiarrugas a partir del aceite de semilla de Merey (*Anacardium Occidentale* L.), *Rev. Fac. Ing. UCV*, **25**, 119-131 (2010).
19. S.N. Baharum, H. Bunawan, M.A. Ghani, W.A.W. Mustapha, N.M. Noor, Analysis of the chemical composition of the essential oil of *Polygonum minus* Huds. using two-dimensional gas chromatography-time-of-flight mass spectrometry (GC-TOF MS), *Molecules*, **15**, 7006 (2010).
20. G.T. Tomy, G.A. Stern, D.C.G. Muir, A.T. Fisk, C.D. Cymbalisty, J.B. Westmore, Quantifying C10-C13 polychloroalkanes in environmental samples by high-resolution gas chromatography/electron capture negative ion high-resolution mass spectrometry, *Anal. Chem.*, **69**, 2762-2771 (1997).

21. T. Pérez, D.M. Soler, Y. Rodríguez, A. Escobar, Y. Riverón, I. Morales, Z. Pérez, M. Llanes, Estabilidad en anaquel (segundo año) de un gel de *Rhizophora mangle* L., *Rev. Salud Anim.*, **34**, 178-183 (2012).
22. D.M. Soler, Y. Rodríguez, T. Pérez, Y. Riverón, I.G. Morales, Estabilidad acelerada de un gel de *Rhizophora mangle* L. (mangle rojo) para heridas y quemaduras, *Rev. Cubana Farm.*, **45**, 563-574 (2011).
23. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), "Performance standards for antimicrobial susceptibility testing", 21st international supplements, CLSI Document M100-S21, Wayne, Pennsylvania, 2011.
24. M. Torrenegra-Alarcón, C. Granados-Conde, M. Durán-Lengua, G. León-Méndez, X. Yáñez-Rueda, N. Pájaro-Castro, Composición química y actividad antibacteriana del aceite esencial de *Minthostachys mollis*, *ORINOQUIA-Universidad de los Llanos*, **20**, 67-74 (2016).
25. G. Matiz, M. Osorio, G. León, Actividad antibacteriana *in vitro* de diecinueve aceites esenciales frente a bacterias asociadas al acné, *Rev. Cubana Farm.*, **49**, 103-116 (2015).
26. G. Matiz, M. Osorio, Actividad antibacteriana de extractos de hormigas de los géneros *Crematogaster* y *Solenopsis*, *Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm.*, **42**, 42-55 (2013).
27. G.E. Matiz-Melo, K.F. Fuentes-López, G. León-Méndez, Microencapsulación de aceite esencial de tomillo (*Thymus vulgaris*) en matrices poliméricas de almidón de ñame (*Dioscorea rotundata*) modificado, *Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm.*, **44**, 189-207 (2015).
28. L. Hernández, M. Rodríguez, Actividad antimicrobiana de plantas que crecen en Cuba, *Rev. Cubana Plant. Med.*, **6**, 44-47 (2001).
29. A. Ramírez, L. Stella, D. Marín, Metodologías para evaluar *in vitro* la actividad antibacteriana de compuestos de origen vegetal, *Scientia et Technica*, **15**, 263-268 (2009).
30. S. Gibbons, Plants as a source of bacterial resistance modulators and anti-infective agents, *Phytochem. Rev.*, **4**, 63-78 (2005).
31. L. Franco, G. Matiz, I. Pájaro, H. Gómez, Actividad antibacteriana *in vitro* de extractos y fracciones de *Physalis peruviana* L. y *Caesalpinia pulcherrima* (L.) Swartz, *Boletín Latinoamer. Caribe Plant. Med. Aromát.*, **12**, 230-237 (2013).

32. M. Torrenegra, G. Matiz, G. León, J. Gil, Actividad antibacteriana *in vitro* de aceites esenciales frente a microorganismos implicados en el acné, *Rev. Cubana Farm.*, **49**, 512-523 (2015).
33. A. Rodríguez, I. Paños, Estudio reológico de emulsiones semisólidas de aplicación cutánea, *Anal. Real Acad. Nal. Farm.*, **70**, 307-324 (2004).
34. B. Abu-Jdayil, Modelling the time-dependent rheological behavior of semisolid foodstuffs, *J. Food Eng.*, **57**, 97-102 (2003).
35. A. Muñoz-Acevedo, V.V. Kouznetsov, E.E. Stashenko, Composición y capacidad antioxidante *in vitro* de aceites esenciales ricos en Timol, Carvacrol, trans-Anetol o Estragol, *Salud UIS*, **41**, 287-294 (2009).
36. E. Soto-Mendivil, J. Moreno-Rodríguez, M. Estarrón-Espinosa, J. García-Fajardo, E. Obledo-Vázquez, Chemical composition and fungicidal activity of the essential oil of *Thymus vulgaris* against *Alternaria citri*, *E-Gnosis*, **4**, 1-7 (2006).
37. C. Coy-Barrera, G. Eunice-Acosta, Antibacterial activity and chemical composition of essential oils of rosemary (*Rosmarinus officinalis*), thyme (*Thymus vulgaris*) and turmeric (*Curcuma longa*) from Colombia, *Rev. Cubana Plant. Med.*, **18**, 237-246 (2013).

CÓMO CITAR ESTE ARTÍCULO

M. del R. Osorio-Fortich, G.E. Matiz-Melo, G. León-Méndez, D. López-Olivares, N.P. Pájaro, Evaluación de la acción antiséptica de un jabón líquido utilizando algunos aceites esenciales como agente activo, *Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm.*, **46**(2), 176-187 (2017).

A avaliação mecanística teórica da utilização de oxihidróxido de cobalto (III) em sensores eletroquímicos de tramadol

Volodymyr V. Tkach*^{1,2}, Yana G. Ivanushko¹, Sílvio C. de Oliveira², Reza Ojani³, Petró I. Yagodynets¹

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

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

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

* Correio eletrônico: nightwatcher2401@gmail.com

Recebido em: 20 de Julho de 2016

Aceito em: 02 de Agosto de 2017

RESUMO

A possibilidade da detecção eletroquímica de tramadol *in vivo* e *in vitro* por meio do sensor, baseado em oxihidróxido de cobalto trivalente e no seu compósito com polímeros condutores, foi avaliada do ponto de vista mecanístico. O modelo matemático, correspondente ao mecanismo de oxidação sugerido, foi desenvolvido e analisado, mediante a teoria de estabilidade linear e da análise de bifurcações. Foi detectado que CoO(OH) pode aplicar-se na detecção eletroquímica de tramadol nos valores de pH neutros e levemente alcalinos, correspondentes à oxidação mais eficiente do composto. A possibilidade da aparição de instabilidades oscilatória e monotônica também foi verificada.

Palavras-chave: envolvimento com drogas, tramadol, sensores eletroquímicos, oxihidróxido de cobalto, estado estacionário estável.

SUMMARY

The mechanistic theoretical evaluation of the use of cobalt (III) oxyhydroxide in electrochemical sensors of tramadol

The possibility of tramadol *in vivo* and *in vitro* electrochemical determination by means of the sensor, based on cobalt (III) oxyhydroxide and its composite with conducting polymers was evaluated from the mechanistic point of view. The mathematical model, correspondent to the suggested mechanism, was developed and analyzed by means of linear stability theory and bifurcation analysis. It was shown that CoO(OH) may be applied to the tramadol electrochemical determination in neutral and lightly alkaline pH values, correspondent to the more efficient oxidation of the compound. The possibility of oscillatory and monotonic instabilities has also been modified.

Keywords: Drug dependence, tramadol, electrochemical sensors, cobalt oxyhydroxide, stable steady-state.

INTRODUÇÃO

O envolvimento de jovens com drogas é um problema não só de pais e familiares deles, mas também da sociedade inteira [1-5]. É um fenômeno bastante antigo na história da humanidade e constitui um grave problema de saúde pública, com sérias consequências pessoais e sociais, levando ao aumento de criminalidade juvenil, de casos da insanidade mental e até de mutações genéticas em filhos dos jovens envolvidos em consumo de drogas [6, 7]. Outro problema que sobressai é o combate ao seu tráfico [8-10]. Ambos os problemas são especialmente atuais nos países em desenvolvimento.

Por outro lado, o tramadol (*rac*-(1R,2R)-2-(didimetilaminometil)-1-(3-metoxifenil)-ciclohexanol – CAS: 27203-92-5) é um analgésico muito forte (pertencendo à classe de opioides) e tem ação muito rápida [11-16]. No entanto, o seu quadro de desempenho apresenta múltiplos efeitos colaterais [17]. No caso de uso excessivo, ou acompanhado pelo uso de várias outras substâncias, pode causar dependência e até levar à morte. Em alguns países como a Espanha [18], Ucrânia, [19], Bielorrússia [20], Austrália [21] e alguns dos Estados Unidos [22], tramadol é considerado uma substância, passível de uso médico, mas cuja venda não licenciada e não controlada é qualificada como tráfico de drogas (sendo a Ucrânia o primeiro país no mundo a reconhecer tramadol como droga). No Brasil, a venda de tramadol é permitida somente com retenção da receita, em quantidades

não superiores a 100 mg por unidade posológica [23]. Outrossim, é planejada a inclusão da substância na lista de doping [24]. Destarte, o desenvolvimento de métodos precisos e exatos da quantificação de tramadol é muito importante tanto para fins de controle de tratamento, como para fins de perícia policial, ou desportiva [25-28], e o uso de métodos eletroquímicos, envolvendo elétrodos quimicamente modificados, já usados para vários compostos biologicamente ativos [29-35], é uma possibilidade da sua solução.

Um dos materiais modificadores, que pode ser capaz de auxiliar a eletrooxidação de tramadol é o oxihidróxido de cobalto trivalente $\text{CoO}(\text{OH})$, um semicondutor do tipo p, visto por alguns pesquisadores [36-40] como alternativa ao dióxido de titânio nos sistemas de foto e fotoeletrocatalise. O estudo das suas propriedades eletroanalíticas começou recentemente [41, 42], mas já foi mostrado, experimental e teoricamente [43-46], que o $\text{CoO}(\text{OH})$ pode ser ótimo mediador de oxidação de compostos orgânicos em meios neutro e levemente alcalino. Um estudo com tramadol [47] mostrou que o valor do pH, em que a sua eletrooxidação é mais eficiente, é de 9,2. Destarte, é possível afirmar que, em princípio, $\text{CoO}(\text{OH})$ pode auxiliar a oxidação de tramadol, já que este valor de pH está dentro da faixa do seu melhor desempenho.

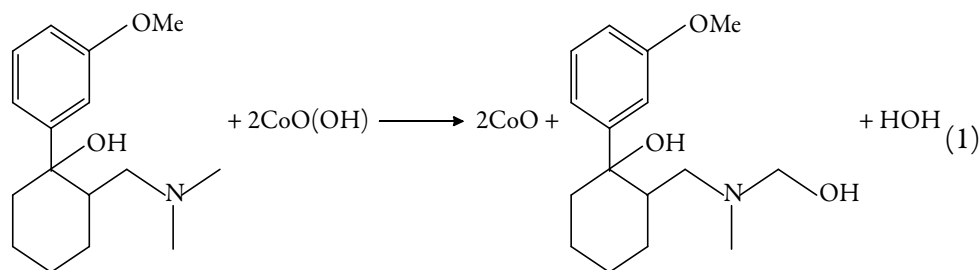
No entanto, já foi detectado que os processos, envolvendo a eletrossíntese de $\text{CoO}(\text{OH})$, podem ser acompanhados por instabilidades eletroquímicas [48, 49], cuja presença pode alterar muito o sinal analítico. As suas causas mais prováveis só podem ser detectadas mediante o desenvolvimento de um modelo matemático, capaz de descrever adequadamente os processos neste sistema.

Assim, o objetivo geral deste trabalho é a avaliação mecanística da possibilidade de o $\text{CoO}(\text{OH})$ ser modificador do elétrodo para auxiliar a oxidação do tramadol. A realização deste objetivo requer o alcance dos objetivos específicos:

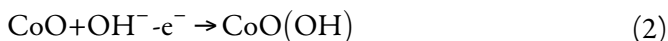
- A sugestão do mecanismo da reação, incluindo o desempenho de $\text{CoO}(\text{OH})$ no processo;
- O desenvolvimento de modelo, na base deste mecanismo;
- Análise de estabilidade do estado estacionário neste sistema (na base do modelo);
- Verificação da possibilidade das instabilidades eletroquímicas nele;
- Comparação do seu comportamento com o dos sistemas semelhantes [41-46].

O SISTEMA E O SEU MODELO

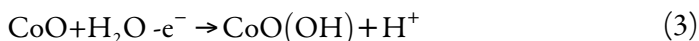
O conhecimento dos aspectos experimentais da eletrooxidação de tramadol [47] e do desempenho de oxihidróxido de cobalto (III) [41, 42] deixa sugerir, teoricamente, o mecanismo da oxidação de tramadol sobre $\text{CoO}(\text{OH})$ como:



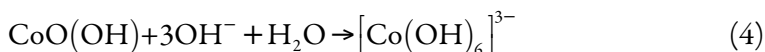
$\text{CoO}(\text{OH})$ é regenerado, em meio básico, conforme a reação:



e em meio neutro, conforme:



Haja vista a saída dos prótons [47], o meio levemente alcalino é mais favorável à eletrooxidação de tramadol. Por outro lado, o pH muito alto (superior a 11-12) pode levar à oxidação direta do tramadol pela hidroxila, à hidrólise do grupo metoxi, e pela dissolução de $\text{CoO}(\text{OH})$ conforme:



Destarte, o valor do pH de 9,2 é considerado ótimo para a eletrooxidação e será considerado no modelo. Diante do acima exposto, considerar-se-ão, para efeitos de modelagem, apenas as reações (1) e (2), e, para descrever o comportamento do sistema, introduzir-se-ão as três variáveis:

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

θ – o grau de recobrimento da superfície pelo oxi-hidróxido de cobalto;

a – a concentração do álcali na camada pré-superficial.

Para simplificar a modelagem, supomos que o reator esteja agitando-se intensamente (para menosprezar o fluxo de convecção), que o eletrólito de suporte esteja em excesso (para menosprezar o fluxo de migração). Também é suposto que a distribuição concentracional na camada pré-superficial seja lineal, e a sua espessura, constante, igual a δ .

Dada a ausência, do ponto de vista cinético, das reações laterais da base no valor do pH escolhido, o conjunto de equações de balanço ver-se-á mais fácil que nos casos semelhantes [43-46], e descrever-se-á como:

$$\left\{ \begin{array}{l} \frac{dc}{dt} = \frac{2}{\delta} \left(\frac{\Delta}{\delta} (c_0 - c) - r_1 \right) \\ \frac{d\theta}{dt} = \frac{1}{G} (r_2 - r_1) \\ \frac{da}{dt} = \frac{2}{\delta} \left(\frac{D}{\delta} (a_0 - a) - r_2 \right) \end{array} \right. \quad (5)$$

em que D e Δ são coeficientes de difusão da droga e do álcali correspondentemente, r_1 e r_2 são velocidades das reações (1) e (2), que podem calcular-se como:

$$r_1 = k_1 c \theta^2 \quad (6)$$

$$r_2 = k_2 a (1 - \theta) \exp\left(\frac{F\varphi_0}{RT}\right) \quad (7)$$

c_0 e a_0 são concentrações da droga e do álcali no interior da solução, G é a concentração máxima do $\text{CoO}(\text{OH})$ na superfície do ânodo, os parâmetros k são constantes das respectivas reações, F é o número de Faraday, φ_0 é o salto do potencial, correspondente ao potencial da carga zero, R é a constante universal de gases e T é temperatura absoluta. O salto do potencial depende de θ conforme a relação $\varphi_0 = \gamma\theta$.

É possível ver que a aparência do conjunto de equações se deu semelhante à característica para sensores, baseados em polímeros condutores [50-56]. Isso pode levar à suposição de que a aparição das instabilidades eletroquímicas nele seja menos provável que nos semelhantes [43-46], aproximando-se da observada no caso dos polímeros condutores. A análise do modelo e a sua interpretação discutir-se-ão abaixo.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para investigar o comportamento do sistema da eletrooxidação de tramadol, auxiliada por oxihidróxido de cobalto, analisamos o conjunto de equações (5), mediante a teoria de estabilidade linear. A matriz funcional de Jacobi, cujos elementos são calculados para o estado estacionário, ver-se-á como:

$$\begin{pmatrix} a_{11} & a_{12} & a_{13} \\ a_{21} & a_{22} & a_{23} \\ a_{31} & a_{32} & a_{33} \end{pmatrix} \quad (8)$$

Em que:

$$a_{11} = \frac{2}{\delta} \left(-\frac{\Delta}{\delta} - k_1 \theta^2 \right) \quad (9)$$

$$a_{12} = \frac{2}{\delta} (-2k_1 c \theta) \quad (10)$$

$$a_{13} = 0 \quad (11)$$

$$a_{21} = \frac{1}{G} (k_1 \theta^2) \quad (12)$$

$$a_{22} = \frac{1}{G} \left(-2k_1 c \theta - k_2 a \exp\left(\frac{F\varphi_0}{RT}\right) + Y k_2 a (1 - \theta) \exp\left(\frac{F\varphi_0}{RT}\right) \right) \quad (13)$$

$$a_{23} = \frac{1}{G} \left(k_2 (1 - \theta) \exp\left(\frac{F\varphi_0}{RT}\right) \right) \quad (14)$$

$$a_{31} = 0 \quad (15)$$

$$a_{32} = \frac{2}{\delta} \left(k_2 a \exp\left(\frac{F\varphi_0}{RT}\right) - Y k_2 a (1 - \theta) \exp\left(\frac{F\varphi_0}{RT}\right) \right) \quad (16)$$

$$a_{33} = \frac{2}{\delta} \left(-k_2 (1 - \theta) \exp\left(\frac{F\varphi_0}{RT}\right) - \frac{D}{\delta} \right) \quad (17)$$

Observando atentamente as expressões (9), (13) e (17), vê-se que o *comportamento oscilatório* neste sistema é possível, já que existem elementos positivos (referentes à positiva conexão de retorno) na diagonal principal da matriz. Sem embargo, contrariamente aos sistemas semelhantes [43-46], neste, não há oscilações, vinculadas à instabilidade superficial, e o comportamento do sistema se aproxima do observado nos casos da presença dos polímeros condutores [50-56]. Como neles, neste sistema o comportamento oscilatório pode ser causado apenas pelas influências do processo eletroquímico nas capacitâncias da dupla camada elétrica. Nenhuma instabilidade superficial, característica para outros sistemas envolvendo o oxihidróxido de cobalto trivalente, é observada, dada a ausência de reações laterais que levam à dissolução do composto de cobalto.

Analisando o conjunto de equações diferenciais (5), com a aplicação do critério de Routh-Hurwitz, obtemos o requisito de estabilidade do estado estacionário. Para simplificar os cálculos, evitando as expressões grandes, introduzimos as novas variáveis, de modo que o determinante de jacobiano se descreva como:

$$\frac{4}{G\delta^2} \begin{vmatrix} -\kappa_1 - \Xi & -\Omega & 0 \\ -\Xi & \Lambda - \Omega & X \\ 0 & -\Lambda & -X - \kappa_2 \end{vmatrix} \quad (18)$$

Abrindo os parênteses em (18) e aplicando a inequação $\text{Det } J < 0$, saliente do critério de estabilidade do estado estacionário, obtemos a condição desta, expressa sob a forma:

$$-\kappa_1 \Omega X + \kappa_1 \Lambda \kappa_2 - \kappa_1 \Omega \kappa_2 + \Xi \Lambda \kappa_2 < 0 \quad (19a)$$

Garantida-mente satisfeita no caso da negatividade do parâmetro Λ , que descreve a eletrooxidação de CoO a CoO(OH) . A negatividade deste parâmetro define a ausência das influências fortes do processo eletroquímico sobre a DCE, ou o impacto insuficiente destas para superar o efeito estabilizador do decrescimento da área não coberta por CoO(OH) . Como há menos fatores capazes de desestabilizar o estado estacionário neste sistema que nos semelhantes [43-46], dá para afirmar que neste caso a região topológica de estabilidade do estado estacionário será mais vasta. O estado estacionário formar-se-á de forma rápida, e, como ele é correspondente à dependência linear entre o parâmetro eletroquímico e a concentração do composto, é possível afirmar que o sinal analítico será bem interpretado. Disso, dá para fazer a conclusão de que CoO(OH) pode ser compatível com a eletroanálise de tramadol *in vitro* (inclusive na perícia) e, limitadamente, *in vivo*. Reação será controlada pela difusão, já que dos mencionados é um processo mais devagar e uma vez que os seus parâmetros κ_1 e κ_2 estão presentes em

quase todos os elementos da inequação. A influência difusional neste caso também é mais forte que nos sistemas semelhantes [43-46].

No caso da igualdade das influências desestabilizadoras na DCE às estabilizadoras, forma-se a *instabilidade monotônica*. Para obter a sua condição, transformamos a inequação 19a em equação (haja vista a condição $\text{Det } J = 0$), e resolvemo-la relativamente ao parâmetro da eletrossíntese de CoO(OH) Λ .

$$\Lambda(\kappa_1\kappa_2 + \Xi\kappa_2) = \kappa_1(\Omega\kappa_2 + \Omega X) \quad (19b)$$

Disso, a igualdade de influências descrever-se-á como:

$$\Lambda = \frac{\kappa_1(\Omega\kappa_2 + \Omega X)}{(\kappa_1\kappa_2 + \Xi\kappa_2)} \quad (20)$$

Este valor marginal é correspondente ao limite de detecção. Nesta margem, existe a multiplicidade de estados estacionários, cada um instável, pois se destrói, após a mudança das condições da síntese.

No caso da *presença das substâncias interferentes*, também capazes de oxidar-se sobre CoO(OH) , os picos, referentes às suas oxidações podem facilmente ser discriminados do correspondente à presença de tramadol, haja vista as propriedades mediadoras deste material desiguais em relação a eles.

No caso da *presença das substâncias interferentes*, que entram em reação com o analito e com o CoO(OH) , o sistema aproximar-se-á aos semelhantes, descritos em [43-46].

A *aplicabilidade* deste modelo também se estende aos sistemas com polímeros condutores, cuja reversibilidade se alcança com a presença de uma substância adicional.

CONCLUSÕES

A análise teórica da possibilidade de uso de CoO(OH) na detecção eletroquímica de tramadol deixou concluir que:

- CoO(OH) , haja vista a estabilidade do material e capacidade de oxidar o tramadol, pode ser usado na eletrooxidação deste. A estabilidade do estado estacionário mantém-se numa ampla região topológica de parâmetros, o que significa que a resposta do sensor é fácil de interpretar;

- Contrariamente aos sistemas semelhantes, envolvendo $\text{CoO}(\text{OH})$, a estabilidade do estado estacionário só pode ser comprometida pelas influências eletroquímicas. Nenhuma instabilidade superficial, característica para outros sistemas com a dissolução, é possível. A reação será controlada pela difusão.
- O comportamento oscilatório neste sistema é menos provável que nos outros casos de uso de $\text{CoO}(\text{OH})$, aproximando-se a probabilidade à do caso do uso dos polímeros condutores, sendo-lhe a causa apenas as influências eletroquímicas das capacitâncias da dupla camada elétrica.

CONFLITO DE INTERESSES

Os autores declaram que não há conflito de interesses.

REFERÊNCIAS

1. M. de Brito-Santos, C.L.N. do Amaral-Costa, O uso de drogas na adolescência, *Cad. Grad. Ciên. Hum. Soc.*, **1**, 143 (2013).
2. URL: http://www.bbc.com/ukrainian/health/2013/07/130729_un_ukraine_drugs_aids_az - acesso aos 19 de julho de 2016.
3. I.O. Roshchyna, O vício de drogas: estado atual e meios do combate (um paradigma moderno), *Visn. Krym. Sudoch.*, **2**, 175 (2015) (publicado em ucraniano).
4. URL: <http://www.cdc.gov/nchs/fastats/drug-use-illegal.htm>, acesso aos 19 de julho de 2016.
5. A. Camacho, A. Gaviria, C. Rodríguez, “El consumo de droga en Colombia”, Universidad de los Andes, ISSN: 1657-7191, URL: https://economia.uniandes.edu.co/components/com_booklibrary/ebooks/dcede2010-22.pdf.
6. A.J. de Almeida-Filho, M. de Assunção Ferreira, M. da Luz Barbosa Gomes *et al.*, O adolescente e as drogas: conseqüências para a saúde, *Esc. Anna Nery. Rev. Enf.*, **11**, 605 (2007).
7. A.S. Reece, G.K. Hulse, Chromothripsis and epigenomics complete causality criteria for cannabis- and addiction-connected carcinogenicity, congenital toxicity and heritable genotoxicity, *Mut. Res. Fund. Mol. Mech. Mutagenesis*, **789**, 15 (2016).
8. URL: <http://obid.senad.gov.br/obid/dados-informacoes-sobre-drogas/pesquisa-e-estatisticas> - acesso aos 19 de julho de 2016.

9. URL: <http://www.cn.npu.gov.ua/uk/publish/article/81683>, acesso aos 19 de julho de 2016.
10. URL: <http://outremers360.com/societe/trafic-de-drogue-prise-record-pour-les-douaniers-guyanais/>, acesso aos 19 de julho de 2016.
11. R.B. Raffa, D.J. Stone, Unexceptional seizure potential of tramadol or its enantiomers or metabolites in mice, *J. Pharm. Exp. Ther.*, **325**, 500 (2008).
12. K.S. Lewis, N.H. Han, Tramadol: A new centrally acting analgesic, *Amer. J. Health. Sys. Pharm.*, **15**, 643 (1997).
13. T.J. Schnitzer, W.L. Gray, R.Z. Paster, M. Kamin, Efficacy of tramadol in treatment of chronic low back pain, *J. Rheumat.*, **271**, 772 (2000).
14. M. van der Laar, J.V. Pergolizzi, H.-U. Melinghoff *et al.*, Pain treatment in arthritis-related pain: Beyond NSAIDs, *Open Rheumat. J.*, **6**, 320 (2012).
15. S. Grond, A. Sablotzki, Clinical pharmacology of tramadol, *Clin. Pharmacokinet.*, **43**, 879 (2004).
16. C.R. Lee, D. McTavish, E.M. Sorkin, Tramadol. A preliminary review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic potential in acute and chronic pain states, *Drugs*, **46**, 313 (1993).
17. P.C. Langley, A.D. Patkar, K.A. Bosswell *et al.*, Adverse event profile of tramadol in recent clinical studies of chronic osteoarthritis pain, *Curr. Med. Res. Op.*, **26**, 239 (2010).
18. URL: https://www.drugs.com/mtm_esp/tramadol.html, acesso aos 19 de julho de 2016.
19. URL: <http://zakon3.rada.gov.ua/laws/show/z0512-00>, acesso aos 19 de julho de 2016.
20. URL: <http://www.medseek.by/belarus/189-belarus-vnesla-tramadol-v-spisok-narkotikov.html>, acesso aos 19 de julho de 2016.
21. S. Rossi (editor), “Australian Medicines Handbook” (2013 ed.), The Australian Medicines Handbook Unit Trust, Adelaide (ISBN 978-0-9805790-9-3), 2013.
22. URL: <http://www.nabp.net/news/tennessee-news-tramadol-and-carisoprodol-now-classified-schedule-iv>, acesso aos 19 de julho de 2016.

23. URL: http://www.crfce.org.br/novo/images/Orientacoes-para-Dispensacao-de-Medicamentos-Controlados-2015_23062015.pdf, acesso aos 19 de julho de 2016.
24. URL: <https://www.wada-ama.org/en/resources/research/tramadol-and-sport-effects-on-physical-and-sustained-attention-performance-during>, acesso aos 19 de julho de 2016.
25. B. Yilmaz, A.F. Erdem, J. Simultaneous determination of tramadol and its metabolite in human urine by the gas chromatography-mass spectrometry method, *Chromatogr. Sci.*, **53**, 1037 (2015).
26. S. Manish, V. Vivek, A new RP-HPLC method development and validation for the simultaneous estimation of ketorolac tromethamine and tramadol hydrochloride in pharmaceutical dosage forms, *J. Drug. Del. Ther.*, **4**, 63 (2014).
27. E.M. Garrido, J.M. Garrido, F. Borges, C. Delerue-Matos, Development of electrochemical methods for determination of tramadol-analytical application to pharmaceutical dosage forms, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **32**, 985 (2003).
28. A.A. Hathoot, M.E. Fahmy, M.A. Azzem, Electrooxidation and determination of tramadol in the presence of dopamine at poly 1,8-diaminonaphthalene derivative modified platinum electrode, *Int. J. Chem. Mat. Sci.*, **1**, 45 (2013).
29. M. Lin, A dopamine electrochemical sensor based on gold nanoparticles/overoxidized polypyrrole nanotube composite arrays, *RSC Adv.*, **5**, 9848 (2015).
30. C.C. Vishwanath, B. Kumara Swamy, Electrochemical studies of paracetamol at poly (aniline blue) modified carbon paste electrode: A voltammetric study, *Anal. Bioanal. Electrochem.*, **6**, 573 (2014).
31. 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).
32. 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).
33. J.B. Raoof, A. Kiani, R. Ojani, R. Valliolahi, Electrochemical determination of dopamine using banana-MWCNTs modified carbon paste electrode, *Anal. Bioanal. Electrochem.*, **3**, 59 (2011).

34. T. Khajvand, R. Ojani, J.B. Raoof, Tetrachloro ortho benzoquinone as catalyst for electrocatalytic oxidation of sulfite in acidic media and its analytical application, *Anal. Bioanal. Electrochem.*, **6**, 501 (2014).
35. S.Z. Mohammadi, H. Beitollahi, E.B. Asadi, Electrochemical determination of hydrazine using a ZrO₂ nanoparticles-modified carbon paste electrode, *Environm. Monit. Assess.*, **187**, 121 (2015).
36. J. Yang, H. Liu, W.N. Martens, R.L. Frost, Synthesis and characterization of cobalt hydroxide, cobalt oxyhydroxide, and cobalt oxide nanodiscs, *J. Phys. Chem. C*, **114**, 111 (2010).
37. J.W. Wang, Yi Ming-Kuo, Hierarchically porous cobalt oxyhydroxide derived from Morpho-butterfly wings: Preparation, characterization, and carbon monoxide detection at low temperatures, *Phys. Stat. Sol.*, **210**, 494 (2013).
38. A.D. Jagadale, D.P. Dubal, C.D. Lokhande, Electrochemical behavior of potentiodynamically deposited cobalt oxyhydroxide (CoOOH) thin films for supercapacitor application, *Mat. Res. Bull.*, **47**, 672 (2012).
39. Y. Cen, Y. Yang, R.Q. Yu *et al.*, A cobalt oxyhydroxide nanoflake-based nanoprobe for the sensitive fluorescence detection of T4 polynucleotide kinase activity and inhibition, *Nanoscale*, **15**, 8202 (2016).
40. Y. Yang, Y. Cen, W. Deng *et al.*, An aptasensor based on cobalt oxyhydroxide nanosheets for the detection of thrombin, *Anal. Meth.*, **8**, 7199 (2016).
41. A. Stadnik, E.M. Caldas, A. Galli, F.J. Anaisi, Eletrodo modificado com [CoO(OH)] coloidal aplicado na detecção de ácido oxálico, *Orbital. Elec. J. Chem.*, **7**, 122 (2015).
42. J.S. Bonini, F.Q. Mariani, E. Guimarães-Castro *et al.*, Partículas de CoO(OH) dispersas em pasta de carbono aplicado na eletrooxidação de compostos fenólicos, *Orbital Elec. J. Chem.*, **7**, 318 (2015).
43. V. Tkach, S.C. de Oliveira, G. Maia *et al.*, The mathematical investigation for the mechanism of the electrochemical oxidation of phenolic compounds over CoO(OH) in alkaline solution, *Mor. J. Chem.*, **4**, 157 (2016).
44. V. Tkach, S.C. de Oliveira, F.J. Anaisi *et al.*, The mechanism of electroanalytical function of CoO(OH) in the oxalic acid electrochemical determination and its mathematical representation, *Anal. Bioanal. Electrochem.*, **8**, 1 (2016).

45. V. Tkach, S.C. de Oliveira, G. Maia *et al.*, The mechanism for the electrooxidation of procarbazine pharmaceutical preparation in alkaline media and its mathematical description, *Chim. Techn. Acta*, **3**, 30 (2016).
46. V. Tkach, S.C. de Oliveira, S.C.B. de Oliveira *et al.*, The electrochemical oxidation of procarbazine on cobalt(III)oxyhydroxide and its mathematical evaluation, *Anal. Bioanal. Electrochem.*, **8**, 432 (2016).
47. D. Patil, N.M. Gokavi, A.M. Bagoji, S.T. Nandibewoor, Electrochemical characterization and determination of tramadol drug using graphite pencil electrode, *Anal. Bioanal. Electrochem.*, **8**, 78 (2016).
48. O. Stadnik, N. Ivanova, Y. Boldyrev, 218th Int. Electrochem. Soc. Meeting. Abstract # 2240, URL: <http://ma.ecsdl.org/content/MA2010-02/38/2240.full.pdf>, acesso aos 08 de agosto de 2015.
49. O. Stadnik, Synthesis, electrochemical and photoelectrochemical properties of the oxide-hydroxide compounds of cobalt, Diss. Kand. Chim. N. - Kyiv., 2011.
50. V. Tkach, V. Nechyporuk, P. Yagodynets', A investigação matemática do desempenho de biossensores eletroquímicos enzimáticos, baseados nos polímeros condutores, *Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm.*, **41**, 203 (2012).
51. V. Tkach, V. Nechyporuk, P. Yagodynets', Mathematical model of the work of the mediated conducting polymer sensors with the use of the polymers of heterocyclic compounds, *Rev. Soc. Quím. Perú*, **77**, 259 (2011).
52. 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).
53. V. Tkach, B. Kumara-Swamy, R. Ojani *et al.*, 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).
54. 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).
55. V. Tkach, H. Nascimento, V. Nechyporuk, P. Yagodynets', A descrição matemática do desempenho de sensores e biossensores eletroquímicos de pH, baseados em polímeros condutores, no processo de medição do pH dos líquidos de cavidade bucal no modo de voltagem constante, *Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm.*, **43**, 119 (2014).

56. V. Tkach, G. Maia, S.C. de Oliveira *et al.*, O estudo de estabilidade do Estado estacionário no desempenho do sensor seletivo dos íons de metais transitivos, baseado em polipirrol, dopado pelo ácido 5-sulfosalicílico, *Quím. Mater.*, **4**, 7 (2014).

COMO CITAR ESTE ARTIGO

V.V. Tkach, Y.G. Ivanushko, S.C. de Oliveira, R. Ojani, P.I. Yagodynets, A avaliação mecanística teórica da utilização de oxihidróxido de cobalto (III) em sensores eletroquímicos de tramadol, *Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm.*, **46** (2), 188-201 (2017).

Validación de una metodología analítica por HPLC-DAD para la cuantificación de cafeína en un ensayo de permeación *in vitro* empleando mucosa oral porcina

Lina M. Sanabria¹, Jorge A. Martínez^{2**}, Yolima Baena^{1*}

¹ Universidad Nacional de Colombia, Sede Bogotá, Facultad de Ciencias, Departamento de Farmacia, Grupo de Investigación Sistemas para la liberación controlada de moléculas biológicamente activas (Silicomoba), carrera 30 No. 45-03, Bogotá, D. C. (111311), Colombia.

² Universidad Nacional de Colombia, Sede Bogotá, Facultad de Ciencias, Departamento de Farmacia, Grupo de Investigación Aseguramiento de la Calidad, carrera 30 No. 45-03, Bogotá, D. C. (111311), Colombia.

* Correo electrónico: ybaenaa@unal.edu.co

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

Recibido para evaluación: 7 de abril de 2017

Aceptado para publicación: 3 de agosto de 2017

RESUMEN

En este artículo se presentan los resultados del desarrollo y validación de una metodología analítica por cromatografía líquida de alta eficiencia con detector de arreglo de diodos (HPLC-DAD) para la cuantificación de cafeína; se utilizó una columna C₁₈ con detección UV a 273 nm y una fase móvil compuesta por agua/acetronitrilo (80:20 v/v) de modo isocrático. Las características de desempeño evaluadas permitieron comprobar que existe una adecuada selectividad, una linealidad entre 0,5 y 50 ug/mL, con una precisión expresada como RSD menor a 2%, un porcentaje de recuperación del 99,9% y unos límites de detección y cuantificación para el método de 2,99 y 2,69 ng/mL, respectivamente. El método propuesto es útil para determinar el perfil de permeación bucal de la cafeína mediante un estudio *in vitro* con celdas de Franz empleando membrana bucal porcina.

Palabras clave: validación, cafeína, HPLC, permeabilidad, mucosa bucal, celdas de Franz.

SUMMARY

Validation of an analytical HPLC-DAD methodology for the quantification of caffeine in an *in vitro* permeation test using porcine buccal mucosa

This paper presents the results of the development and validation of an analytical methodology through high performance liquid chromatography with a diode array detector (HPLC-DAD) for the quantification of caffeine, using a C₁₈ reverse phase column with UV detection at 273 nm and a mobile phase consisting exclusively of water/acetonitrile (80:20 v/v). The evaluated performance characteristics allowed to verify that there is an adequate selectivity, a linearity between 0.5 and 50 µg/mL, with precision expressed as RSD in less than 2%, a recovery rate of 99.9%, and limits of detection and quantification for the method of 2.99 and 2.69 ng/mL respectively. The proposed method is useful for determining the oral permeation profile of caffeine by an *in vitro* study with Franz cells using porcine buccal membrane.

Keywords: Validation, caffeine, HPLC, permeability, buccal mucosa, Franz cells.

INTRODUCCIÓN

La ruta más utilizada en la administración de fármacos es la vía peroral, dado que es cómoda, económica y, por lo general, más inocua; sin embargo, presenta varias desventajas significativas dentro de las cuales se destacan: la degradación de algunos principios activos por enzimas digestivas o pH gástrico ácido, anomalías en la absorción en presencia de alimentos, la necesidad de contar con la colaboración del paciente, así como el efecto de primer paso hepático [1]. A partir de estos inconvenientes, desde hace varios años ha existido un gran interés en el uso de la mucosa bucal por tener un área de superficie grande, lisa y relativamente inmóvil, con resistencia sustancial a la irritación o daño, además de estar equipada para el suministro sistémico de fármacos [2-6].

El potencial de las moléculas a ser administradas por vía bucal es investigado por metodologías *in vivo* o *in vitro*; considerándose las pruebas de permeabilidad con tejido bucal animal aislado en celdas de Franz, el método *in vitro* más utilizado para determinar la cantidad de fármaco que se difunde a través del tejido en el tiempo, siendo posible evaluar la cinética de transporte a través de la mucosa. Gracias a la semejanza reportada de la mucosa bucal porcina en cuanto a estructura y permeabilidad con la mucosa bucal humana, el cerdo se ha convertido en el modelo animal más

utilizado en estas investigaciones [7, 8]. En este sistema, la mucosa bucal se encuentra separando dos cámaras: una cámara donante donde se dispone el fármaco que entra en contacto con la cara exterior de la mucosa, y una cámara receptora, que simula el medio biológico con el que está en contacto la mucosa. Esta última, es muestreada periódicamente para evaluar la cantidad de compuesto que ha penetrado el tejido con el tiempo y presenta una barra de agitación que mantiene en condiciones homogéneas la solución en el compartimento. La temperatura del sistema se conserva a 37 °C mediante una chaqueta de calentamiento en el compartimento receptor, a través del cual recircula agua con la temperatura controlada [8-10]. Considerando las variaciones que existen al utilizar equipos nuevos y las diferencias intrínsecas de la membrana, es importante realizar una adecuada implementación de los ensayos con las celdas de difusión, por lo cual se emplea un fármaco ampliamente conocido y con un perfil de permeación previamente estudiado [11, 12]. Con este fin, se usa cafeína (figura 1) como un fármaco hidrófilo modelo; un alcaloide del grupo de las xantinas, que aumenta de manera ligera la secreción de noradrenalina y estimula la actividad neural en múltiples regiones del encéfalo [1, 12, 13].

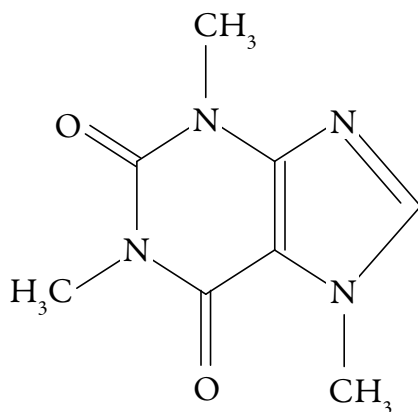


Figura 1. Estructura molecular de la cafeína.

Los métodos analíticos, empleados para la cuantificación de fármacos en estudios con muestras biológicas, pueden influir en la evaluación e interpretación de los datos obtenidos en este tipo de ensayos, resultando fundamental el empleo de métodos analíticos bien caracterizados y validados para obtener resultados fiables que se pueden interpretar adecuadamente. En la literatura se han reportado diferentes metodologías analíticas para la determinación de cafeína en productos farmacéuticos y muestras biológicas [14, 15]; sin embargo, a la fecha no existe una metodología específica que permita evaluar el

paso de este fármaco a través de la mucosa bucal porcina. Gracias a sus características y a las condiciones de trabajo propuestas, este método permite analizar un alto volumen de muestras en un corto tiempo, evaluando las diferentes condiciones de ensayo en las celdas de difusión. Por tanto, el presente trabajo tiene como objetivo validar un método por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) con detector de arreglo de diodos (HPLC-DAD) para cuantificar cafeína y llevar a cabo un estudio de permeación con este activo, empleando mucosa bucal porcina como membrana de estudio

MATERIALES Y MÉTODOS

Reactivos

Cafeína estándar (99%), Sigma-Aldrich (EE. UU., lote: SLB0505V), etanol 98%, reactivo analítico Merck (Alemania, lote: K46066583-445), acetonitrilo grado HPLC Tedia (EE. UU., lote: 905154), solución de Krebs-Ringer-Bicarbonato marca Zen-Bio (EE. UU., lote: 010416), fosfato de potasio monobásico Merck (Alemania, lote: AM0655773518), cloruro de potasio Chemi (EE. UU., lote: 160331-511), cloruro de sodio J. T. Baker (EE. UU., lote: t10c54), fosfato de sodio dibásico Chemi (EE. UU., lote: 160331-512), agua grado HPLC, filtros 0,45 μm Millipore Corp (EE. UU.).

Equipos y condiciones analíticas

Se empleó un cromatógrafo Shimadzu® (Kioto, Japón), serie Prominence, equipado con una bomba binaria LC-6AD, detector de arreglo de diodos (DAD) SPD-M20A, horno CTO-20A, desgasificador DGU-20As y automuestreador SIL20-A. La columna cromatográfica empleada fue una Kromasil® C₁₈, de 4,6 × 150 mm y 5 μm de tamaño de partícula, a una temperatura isocrática de 30 °C, utilizando como fase móvil agua-acetonitrilo (80:20 v/v), con un flujo 1 mL/min, volumen de inyección 10 μL y longitud de onda 273 nm. Las soluciones que estuvieron en contacto con la mucosa se centrifugaron a una velocidad de 7000 rpm durante 6 min y todas las muestras se filtraron antes de inyectarse a través de filtros Millex (Millipore Corporation, EE. UU.) de 0,45 μm . Los datos se procesaron mediante el software LCsolution® versión 1,25. Para la preparación de las muestras y el ensayo de permeación se utilizó: potenciómetro Hanna® referencia HI 2221 (EE. UU.), ultrasonido Cole-Parmer® modelo 8891 (EE. UU.), sistema de purificación de agua Direct-Q® (EE. UU.), celdas de Franz marca PermeGear® (EE. UU.), equipo de filtración al vacío, balanza analítica (sensibilidad de 0,001 g y 0,0001 g) marca Ohaus® serie Pioneer (EE. UU.), baño termostataado Lauda® (EE. UU.), micropipetas (10-100 μL y 100-1.000 μL) marca Select BioProducts® (EE. UU.) y plancha de agitación multipunto IKA® modelo RO 10 PS1 Werke (Alemania).

Material biológico

En los diferentes ensayos se empleó mucosa bucal (mejilla), obtenida de cerdos con un peso de 80-100 kg y con una edad promedio de 4-6 meses; los cuales fueron sacrificados con fines comerciales en el frigorífico aprobado por la autoridad sanitaria competente. Las muestras se almacenaron en solución salina amortiguada con fosfato o Krebs-Ringer-Bicarbonato durante un máximo de 24 h y, en algunos casos, se utilizaron luego de ser sometidas a procesos de refrigeración y congelación durante los cuatro días posteriores al sacrificio. Todos los experimentos se realizaron siguiendo las consideraciones éticas en cuanto a la investigación biomédica con animales [16] y con el aval del Comité de Ética de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional de Colombia (Acta No. 03 de 2016).

Preparación de las muestras

Para la validación del sistema se preparó una solución madre de cafeína (SM-C) por triplicado de 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$. A partir de estas soluciones se hicieron las diluciones para trabajar curvas de calibración en el rango de 0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ a 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$. En la validación del método se utilizó solución salina amortiguada con fosfato (PBS) de pH 7,4 como medio de disolución; la cual estuvo en contacto con la mucosa durante 4 h a una temperatura de 37 °C, simulando las condiciones del ensayo de permeación. La mucosa empleada estuvo en un período de almacenamiento de cuatro días en condiciones del mercado, sin medio de almacenamiento, con cortes irregulares involucrando epitelio y tejido conectivo.

Validación de la metodología analítica

La validación del método se realizó teniendo en cuenta los lineamientos establecidos por la Conferencia Internacional de Armonización (ICH, por sus siglas en inglés), las normas de la Asociación Española de Farmacéuticos y la guía para la Industria de Validación de Métodos Bioanalíticos de la Administración de Medicamentos y Alimentos (FDA, por su sigla en inglés) [17-19], y se analizaron las siguientes características de desempeño:

Selectividad/Especificidad

Para establecer la selectividad del método, se analizaron los diferentes componentes de la fase móvil, los medios de almacenamiento utilizados para la mucosa (Krebs-Ringer-Bicarbonato y PBS) y 10 muestras blanco de matriz de 10 mucosas porcinas de procedencia distinta que no estuvieron en contacto con el compuesto modelo obtenidas de diferentes animales. No se observaron interferencias respecto a la solución de cafeína correspondiente a la concentración determinada como límite de cuantificación

en la validación del sistema y método (2,99 y 2,69 ng/mL, respectivamente), teniendo como criterios de evaluación el tiempo de retención (t_r), la similitud de los espectros de absorción molecular (EAM), los isogramas y los topogramas obtenidos.

Las soluciones blanco de las diferentes matrices recolectadas, se montaron por separado en las celdas de Franz a una temperatura de 37 °C, con PBS a pH de 6,8 en la cámara donante y a pH de 7,4 en la cámara receptora. Dichas mucosas se sometieron a procesos de congelación y refrigeración por cuatro días posteriores al sacrificio; y una vez pasadas las 4 h de duración del ensayo, se tomó una alícuota de 500 μ L de la cámara receptora y de 400 μ L en la cámara donante.

Linealidad

Para evaluar la linealidad del sistema y del método, se establecieron seis niveles de concentración: 0,5, 2,5, 5, 10, 25, 50 μ g/mL, cada uno se preparó por triplicado a partir de la dilución de las tres SM-C. La evaluación de la linealidad se hizo por medio del análisis de varianza (ANOVA) para la regresión. El estadístico t de Student se usó para evaluar la pendiente y el intercepto, asumiendo una confianza del 95%.

Precisión

La precisión se determinó mediante la evaluación de la repetibilidad (intradía) y de la precisión intermedia (interdías). El ensayo intradía se estimó mediante análisis por triplicado de tres niveles de concentración (0,5, 10 y 50 μ g/mL) en el mismo día, con el mismo analista y con el mismo equipo. Se evaluó a través del coeficiente de variación promedio ponderado (RSDp), obtenido a partir del test de Cochran, y el valor de aceptación para el método en cada nivel debe ser $C.V \leq 15\%$ [18]; mientras que el criterio de aceptación, al evaluar la repetibilidad del sistema, es que el coeficiente de variación de las medidas sea máximo del 1% [19]. La precisión intermedia se valoró en tres días y con dos analistas, utilizando los tres niveles de concentración del analito (0,5, 10 y 50 μ g/mL) y se evaluó mediante un ANOVA empleando una confianza del 95%.

Exactitud

Se calculó mediante comparación de las pendientes de las curvas de calibración del sistema y del método, evaluando de esta manera todo el rango lineal. Como criterio de aceptación para este parámetro, se fijó un porcentaje de recuperación (%R) entre 95% a 105%, considerando la complejidad de la matriz de la muestra [19].

Límite de detección y cuantificación

Para determinar el límite de detección (LOD) y el límite de cuantificación (LOQ), se prepararon curvas de calibración a bajas concentraciones respecto a las utilizadas

en el estudio de linealidad, empleando cuatro niveles de concentración (0,1, 0,2, 0,3 y 0,4 $\mu\text{g}/\text{mL}$), con seis réplicas a cada nivel.

El límite de detección (ecuación 1) y el límite de cuantificación (ecuación 2) se calcularon mediante los resultados obtenidos para la linealidad y los resultados de una curva de calibración a bajas concentraciones.

Ecuación 1: límite de detección [19]

$$LOD = \frac{|a| + 3Sa}{b * \sqrt{n}}$$

Ecuación 2: límite de cuantificación [19]

$$LOD = \frac{|a| + 10Sa}{b * \sqrt{n}}$$

Donde: Sa = desviación estándar del intercepto a bajas concentraciones, a = intercepto a bajas concentraciones y b = pendiente de la curva de calibración a altas concentraciones.

Estabilidad

La estabilidad del analito se evaluó por triplicado a dos niveles de concentración (0,5 y 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$), en diferentes tiempos y condiciones de almacenamiento. Se consideró el análisis de las muestras en un período de permanencia en el automuestreador y a la temperatura del mismo (24-25 °C), en tres momentos diferentes: recién preparada, luego de 6 h y, finalmente, a las 24 h. También se corroboró la estabilidad en condiciones de almacenamiento a 4 °C en cuatro ocasiones (semanas 1, 2, 3 y 4); los resultados se compararon con los valores encontrados inicialmente (semana 1). Esto permite valorar la estabilidad del analito con base en el tiempo estimado de permanencia a temperatura de refrigeración y tener en cuenta la estabilidad de la cafeína después de diferentes ciclos de enfriamiento - temperatura ambiente (21 °C). Finalmente, se comprobó la estabilidad del analito en la matriz luego de someterse a las condiciones empleadas con las celdas de Franz (37 °C durante 4 h). Como criterio de aceptación, se tuvo en cuenta que los resultados de las muestras de estabilidad debían estar dentro del 15% de las concentraciones nominales [18].

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La cafeína presentó un tiempo de retención de 2,99 +/- 0,02 min, haciendo de este un método rápido y económico para la cuantificación del analito. La idoneidad del sistema

se evaluó mediante el factor de asimetría, el factor de capacidad, la resolución, el factor de separación y el número de platos teóricos (tabla 1), obtenidos a partir de 10 inyecciones del estándar a una concentración de $10 \mu\text{g}/\text{mL}$ y cumpliendo con las especificaciones en todos los casos [19, 20].

Tabla 1. Resultados obtenidos para la idoneidad del sistema.

Parámetro	Valor obtenido	C.V (%)	Criterio de aceptación
Factor de asimetría	1,2	0,4	< 2
Factor de capacidad	1,18	1,9	> 1
Resolución	8,4	4,4	> 2
Factor de separación	2,4	1,3	> 1
Número de platos teóricos	7.725	3,2	> 2.000

La longitud de onda de máxima absorción (λ_{max}) de la cafeína en las muestras biológicas fue de 273 nm y se determinó empleando el EAM y el isograma (figura 2) de una muestra a una concentración de $10 \mu\text{g}/\text{mL}$.

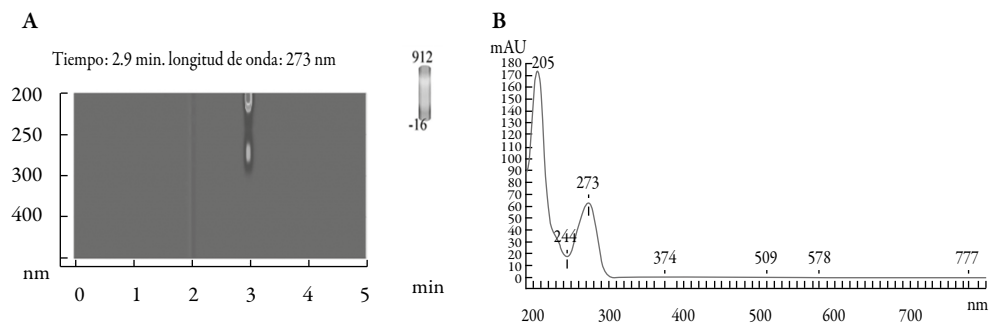


Figura 2. A) Isograma. B) Espectro de absorción molecular (EAM); obtenidos para una solución de cafeína estándar a una concentración de $10 \mu\text{g}/\text{mL}$.

Los cromatogramas obtenidos luego del análisis de los medios de almacenamiento, las matrices blancos con mucosa oral porcina (sin presencia de cafeína) y la fase móvil no mostraron interferentes en el tiempo de retención de la cafeína, ni modificación en el EAM (figura 3), ni en la pureza del pico. Además, se analizó si los diferentes blancos absorbían a la λ_{max} del analito, demostrándose que no tienen incidencia en la cuantificación de la cafeína y verificando la similitud de los EAM y la pureza del pico, entre la lectura del límite de cuantificación correspondiente al sistema y al método. De manera similar, el análisis de la pureza del pico (figura 4) determinó que no se presentan impurezas

y, por tanto, a través de la metodología empleada es posible alcanzar una señal que corresponde inequívocamente al analito de interés sin presencia de interferencia por colución de otros componentes de la matriz.

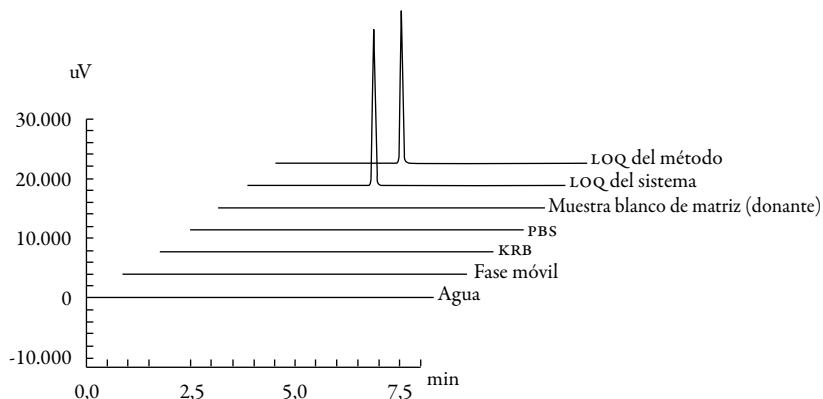


Figura 3. Cromatogramas de la evaluación de selectividad. Datos procesados con el software LCsolution®.

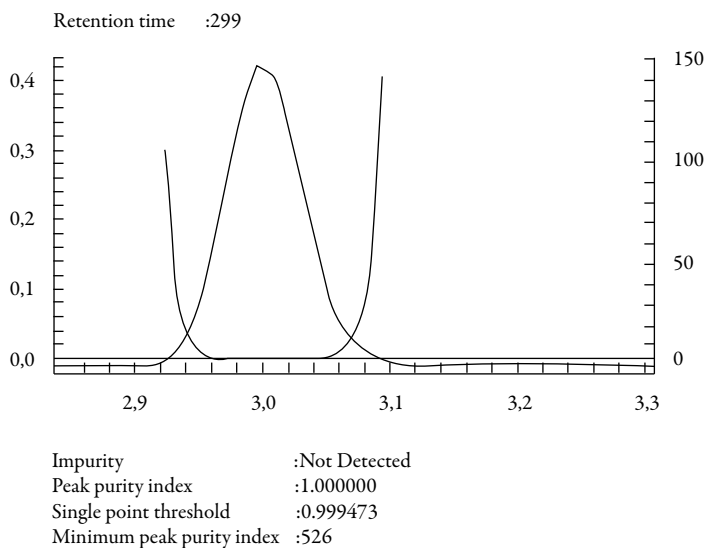


Figura 4. Pureza del pico de cafeína en el método. Datos procesados con el software LCsolution®.

La selectividad de la metodología también puede ser complementada con el estudio de los topogramas obtenidos del DAD (figura 5), en donde gracias a su conformación tridimensional se puede comprobar mediante la corrida cromatografía en un rango de

longitudes de onda, que en el tiempo de retención de la cafeína únicamente está presente dicha sustancia sin presencia de ningún interferente que co-eluya al tiempo de retención del analito de interés.

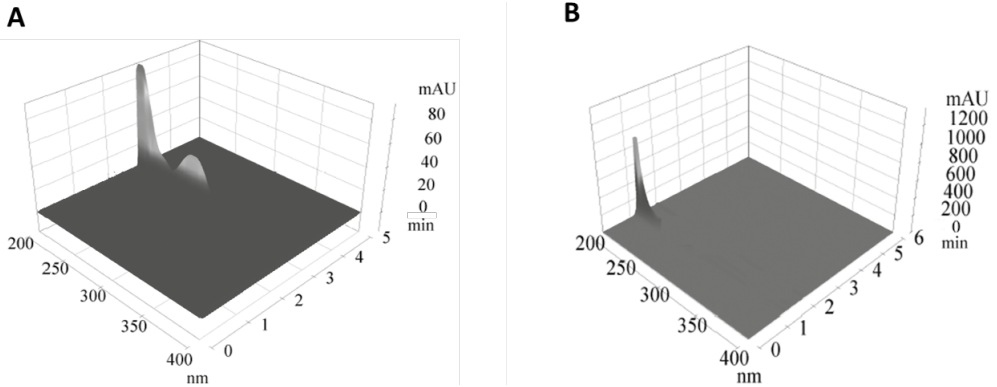


Figura 5. Topogramas obtenidos por HPLC-DAD, para A) LOQ método. B) Muestra blanco.

En cuanto a la linealidad, en la figura 6 se presentan las curvas de calibración (relación de áreas *vs.* concentración) para el sistema y para el método, en las cuales se puede observar un coeficiente de correlación de 0,9999, que indica un alto grado de relación entre la variable x (concentración) y la variable y (respuesta).

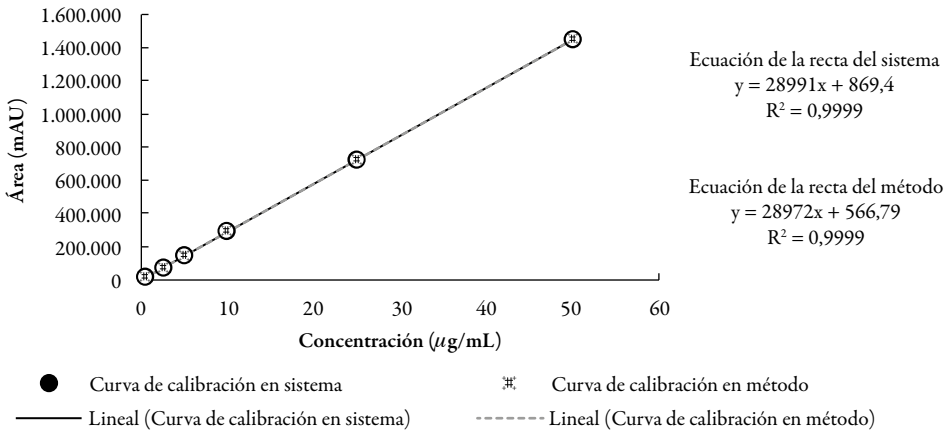


Figura 6. Curvas de calibración para el sistema y para el método.

Por otra parte, se hicieron pruebas de hipótesis para el intercepto, la pendiente y el coeficiente de correlación de las curvas de calibración, mediante el estadístico t de Student (tabla 2).

Tabla 2. Prueba t para evaluar la linealidad del sistema y del método.

	Parámetro	H_0	t estimado	t tabla	Criterio
Sistema	Intercepto	$a = 0$	0,434	2,1199	No se rechaza H_0
	Pendiente	$b \neq 0$	337,308	2,1199	No se rechaza H_0
	Correlación	<i>No existe correlación entre X-Y</i>	168,654	2,1199	Se rechaza H_0
Método	Intercepto	$a = 0$	0,300	2,1199	No se rechaza H_0
	Pendiente	$b \neq 0$	357,452	2,1199	No se rechaza H_0
	Correlación	<i>No existe correlación entre X-Y</i>	178,726	2,1199	Se rechaza H_0

El test para el intercepto en el sistema y método arrojó un t estimado $< t$ tabla, por tanto, no se rechazó H_0 ; afirma que la recta presenta un intercepto con el eje Y que no es significativamente diferente de cero y una convergencia al origen. Con respecto a las pendientes, se encontraron valores experimentales de t mayores a los tabulados, por consiguiente, no se rechazó H_0 ; es decir, las pendientes diferentes de cero son significativas. Además, la prueba de hipótesis para el coeficiente de correlación exhibió un t experimental $> t$ tabla, lo cual llevó a rechazar H_0 , asumiendo que hay correlación significativa entre las dos variables, concentración (X) y área bajo la curva (Y) con un nivel de confiabilidad del 95%, mostrando que los datos experimentales se ajustan al modelo de regresión lineal.

Mediante el ANOVA y estadístico de Fisher (tabla 3) para la regresión se encontró en todos los casos que el F experimental fue mayor al F tabulado, quedando demostrada la regresión significativa para el sistema y para el método. El mismo test indicó un desvío de la linealidad no significativo (F experimental $> F$ tabulado), ya que estadísticamente no hay dispersión de los resultados entre réplicas para las distintas concentraciones. Lo anterior permite afirmar que, dentro de los rangos de concentración estudiados, tanto para el sistema como para el método, se obtuvo un comportamiento lineal.

Para evaluar la precisión intradía, se tomaron muestras preparadas por triplicado a tres niveles de concentración (0,5, 10 y 50 $\mu\text{g/mL}$), y se empleó el test Cochran. Tal como se evidencia en las tablas 4 y 5, para cada uno de los casos se observó un valor de G_{exp} menor al G_{tab} , lo cual indica que las varianzas no son estadísticamente diferentes entre sí; es decir, las varianzas de las concentraciones son homogéneas e indican que el factor concentración no influye en la dispersión de los resultados [19].

Tabla 3. ANOVA de la regresión lineal para el sistema y para el método, prueba de F .

	Parámetro	Grados de libertad (gl)	Suma de cuadrados (SC)	Cuadrado medio (CM)	F_o	F_t
Sistema	Regresión	1	4,6E + 12	4,6E + 12	113776,6	4,49
	Error	16	643543530	40221470,6		
	Desvío	4	94836755,2	23709188,8	0,5	3,26
	Dentro	12	548706775	45725564,6		
	Total	17	4,6E + 12	2,7E + 11		
Método	Regresión	1	4,6E + 12	4,570E + 12	127772,3	4,49
	Error	16	572336540,4	35771033,78		
	Desvío	4	89018024,4	22254506,11	0,6	3,26
	Dentro	12	483318516	40276543		
	Total	17	4,6E + 12	2689E + 11		

Tabla 4. Resultados del test de Cochran para la evaluación de la precisión del sistema.

	Concentración ($\mu\text{g/mL}$)		
	0,5	10	50
X	15954	292034,667	1448355,333
S	312,725	2155,108	3188,174
C.V (%)	1,9601	0,738	0,220
		G_{exp}	0,682
		G_{tab}	0,8709
		RSD_p	1,21

X = promedio de las áreas, S = desviación estándar, $C.V(\%)$ = porcentaje del coeficiente de variación.

Además, se obtuvo unos RSDP considerablemente inferiores al valor máximo permitido, que es del 15%, lo que brinda un nivel de precisión confiable sobre las mismas condiciones de operación en un intervalo corto de tiempo. En el caso de la precisión intermedia, el análisis de varianza, mediante un test F , mostró que los valores de F experimentales son menores a los F tabulados (tabla 6), indicando que los resultados no presentan una diferencia estadísticamente significativa por cambio de analista o al realizar el análisis en diferentes días.

Tabla 5. Resultados del test de Cochran para la evaluación de la precisión del método.

	Concentración ($\mu\text{g/mL}$)		
	0,5	10	50
X	15815	289802	1447201,67
S	409,528	3212,214	6264,541
C.V (%)	2,589	1,108	0,433
		G_{exp}	0,789
		G_{tab}	0,8709
		RSD_p	1,64

X = promedio de las áreas, S = desviación estándar, $C.V(\%)$ = porcentaje del coeficiente de variación.

Tabla 6. Precisión intermedia y análisis de varianza del sistema y del método.

	Fuente de variación	Grados de libertad (gl)	Suma de cuadrados (SC)	Cuadro medio (CM)	F_o	F_t
Sistema	Analista	1	4469189,3	4469189,4	1,0E - 05	4,04 (1, 48, 0,05)
	Días	2	682705646,8	341352823,4	7,9E - 04	3,19 (2, 48, 0,05)
	Réplicas	2	2688920,1	1344460,1	3,1E - 06	3,19 (2, 48, 0,05)
	Error	48	2,1E + 13	4,4E + 11		
	Total	53	2,1E + 13			
Método	Analista	1	1843396389	1843396389	4,4E - 03	4,04 (1, 48, 0,05)
	Días	2	119825541,4	59912770,7	1,4E - 04	3,19 (2, 48, 0,05)
	Réplicas	2	359055209,9	179527605	4,3E - 04	3,19 (2, 48, 0,05)
	Error	48	2,0E + 13	4,2E + 11		
	Total	53	2,0E + 13			

Con base en los lineamientos de la guía de la FDA para la validación de métodos bioanalíticos, se cumple con la repetibilidad y la precisión intermedia, por lo cual se concluye que el método es preciso [18].

Por medio de la comparación de las pendientes de las curvas de calibración del sistema y del método, se evaluó todo el rango lineal, obteniendo 99,9% de porcentaje de recuperación; por lo cual, se estableció que la exactitud del método es correcta.

Los límites de cuantificación y detección se calcularon utilizando las curvas de calibración para sistema y método y unas segundas curvas de concentraciones bajas, a las cuales se les comprobó la linealidad, precisión y exactitud. Los resultados obtenidos se consignan en la tabla 7, y se utilizaron para calcular tanto el límite de detección como el límite de cuantificación, cuyos valores fueron de 0,93 y 0,85 ng/mL para el límite de detección en el sistema y método; y de 2,99 y 2,69 ng/mL para el límite de cuantificación del sistema y método, respectivamente.

Tabla 7. Datos para el cálculo del límite de detección y cuantificación.

	Curva de calibración a bajas concentraciones	LOD ($\mu\text{g/mL}$)	LOQ ($\mu\text{g/mL}$)
Sistema	$n = 24$ Ecuación: $y = 31476x - 6,7$ $S_a = 41,9$	0,00093	0,00299
Método	$n = 24$ Ecuación: $y = 31442x + 8,8$ $S_a = 37,4$	0,00085	0,00269

Al evaluar la estabilidad de las muestras a corto plazo en el automuestreador durante 24 h a una temperatura de 24-25 °C (tabla 8) respecto a la lectura de las muestras recién preparadas tomadas como el 100%, se observa una degradación del analito inferior al 2%, la cual se puede considerar despreciable teniendo en cuenta que un estudio similar enfocado al seguimiento de la estabilidad de cafeína en matriz biológica sugiere un límite del 10% [14] y que se tiene como criterio de aceptación que estén dentro del 15% de las concentraciones nominales [18]. El porcentaje de variación mayor fue a las 24 h, el cual es un intervalo de tiempo alto, considerando que el tiempo de corrida del método es de 8 min y, por tanto, podrían realizarse hasta 180 inyecciones obteniendo resultados veraces dentro de los límites de desviación permitidos.

Al determinar la estabilidad a largo plazo como porcentaje de pérdida o ganancia, respecto a la lectura de las muestras recién preparadas tomadas como el 100% (semana 1), se apreció una degradación inferior al 2% en la mayoría de las condiciones, excepto a la semana 4 donde se observó una pérdida mayor del analito (tabla 9). Sin embargo, tal como ocurrió en la estabilidad a corto plazo, se encuentran en un rango aceptado para los criterios establecidos en metodologías bioanalíticas, por tanto se garantiza la estabilidad del analito durante este período de tiempo [18].

Tabla 8. Estabilidad a corto plazo en el automuestreador.

	Concentración $\mu\text{g/mL}$	Pérdida/ganancia (%)	
		6 h	24 h
Sistema	0,5	-0,31	-0,93
	25	-0,06	-0,04
Método	0,5	-0,79	-1,51
	25	-0,16	-0,21

Tabla 9. Estabilidad de cafeína a largo plazo (ciclos de enfriamiento - temperatura ambiente).

	Concentración $\mu\text{g/mL}$	Pérdida/ganancia (%)		
		Semana 2	Semana 3	Semana 4
Sistema	0,5	-1,39	-1,93	-2,10
	25	-0,99	-1,97	-2,94
Método	0,5	-1,36	-2,32	-2,63
	25	-0,21	-0,33	-0,38

Finalmente, se comprobó la estabilidad de las muestras al ser sometidas a las condiciones empleadas en el desarrollo de los ensayos de permeación *in vitro* con celdas de Franz; por lo cual se colocaron a una temperatura de 37 °C durante 4 h. A una concentración de 0,5 $\mu\text{g/mL}$ se observó un porcentaje de ganancia de 0,07% y de 1,17% para una concentración de 25 $\mu\text{g/mL}$, que se puede atribuir a una posible evaporación del solvente. Sin embargo, la variación es aceptable y se logra inferir que el analito es estable durante los ensayos de permeación *in vitro*, sin presentar una pérdida significativa del compuesto en cualquiera de las condiciones investigadas.

CONCLUSIONES

Se logró implementar una metodología analítica por cromatografía líquida de alta eficiencia con detector de arreglo de diodos (DAD), para evaluar la permeación *in vitro* de cafeína a través de la mucosa bucal porcina. Dicha metodología resultó selectiva, precisa, exacta, lineal en el rango de concentraciones de 0,5 a 50 $\mu\text{g/mL}$, con un límite de detección de 0,93 y 0,85 ng/mL en el sistema y método; y un límite de cuantificación de 2,99 y 2,69 ng/mL en el sistema y método, respectivamente; con una estabilidad de las muestras en las condiciones de almacenamiento (4 °C) durante un mes, por un período de 24 h en el automuestreador y durante la realización del ensayo con celdas de Franz.

AGRADECIMIENTOS

Al Departamento de Farmacia de la Universidad Nacional de Colombia, Sede Bogotá, por facilitar los equipos e instalaciones utilizados en el desarrollo de esta investigación.

CONFLICTO DE INTERESES

Los autores no declaran conflicto de intereses.

REFERENCIAS

1. J. Flórez, J. Armijo, A. Mediavilla, "Farmacología humana", 5ª edición, Elsevier Masson Eds., Santander, 2008, p. 684.
2. J. Hao, P.W. Heng, Buccal delivery systems, *Drug Dev. Ind. Pharm.*, **29** (8), 821 (2003).
3. N.V.S. Madhav, A.K. Shakya, P. Shakya, K. Singh, Orotransmucosal drug delivery systems: A review, *J. Control. Rel.*, **140** (1), 2 (2009).
4. V. Hearnden, V. Sankar, K. Hull, D.V. Juras, M. Greenberg, A.R. Kerr *et al.*, New developments and opportunities in oral mucosal drug delivery for local and systemic disease, *Adv. Drug Del. Rev.*, **64** (1), 16 (2012).
5. R.B. Gandhi, J.R. Robinson, Oral cavity as a site for bioadhesive drug delivery, *Adv. Drug Del. Rev.*, **13** (1), 43 (1994).
6. S. Rossi, G. Sandri, C.M. Caramella, Buccal drug delivery: A challenge already won?, *Drug Disc. Today: Technol.*, **2** (1), 59 (2005).
7. J. Nicolazzo, *In vivo* and *in vitro* models for assessing drug absorption across the buccal mucosa. En "Drug absorption studies". Ed. Springer, US, 2008, pp. 89-111.
8. T. Obradovic, *In vitro* models for investigations of buccal drug permeation and metabolism. En "Drug absorption studies", Ed. Springer, US, 2008, pp. 167-181.
9. Y. Sudhakar, K. Kuotsu, A.K. Bandyopadhyay, Buccal bioadhesive drug delivery. A promising option for orally less efficient drugs, *J. Control. Rel.*, **114** (1), 15 (2006).

10. V.F. Patel, F. Liu, M.B. Brown, Modeling the oral cavity: *In vitro* and *in vivo* evaluations of buccal drug delivery systems, *J. Control. Rel.*, **161** (3), 746 (2012).
11. U. Kulkarni, I. Pather, L. Xiaoling, B. Jasti, Porcine buccal mucosa as *in vitro* model: Effect of biological and experimental variables, *J. Pharm. Sci.*, **99** (3), 1265 (2010).
12. U.D. Kulkarni, R. Mahalingam, L. Xiaoling, I. Pather, B. Jasti, Effect of experimental temperature on the permeation of model diffusants across porcine buccal mucosa, *AAPS PharmSciTech*, **12** (2), 579 (2011).
13. J.A. Nicolazzo, B.L. Reed, B.C. Finnin, The effect of various *in vitro* conditions on the permeability characteristics of the buccal mucosa, *J. Pharm. Sci.*, **92** (12), 2399 (2003).
14. R. Ventura, C. Jiménez, N. Closas, J. Segura, R. de la Torre, Stability studies of selected doping agents in urine: Caffeine, *J. Chromatogr. B*, **795** (2), 167 (2003).
15. X.L. Amit Kokate, B. Jasti, Effect of drug lipophilicity and ionization on permeability across the buccal mucosa: A technical note, *AAPS PharmSciTech*, **9** (2), 501 (2008).
16. Ministerio de Salud, República de Colombia. Resolución N° 8430 de 1993. URL: https://www.minsalud.gov.co/Normatividad_Nuevo/RESOLUCION%208430%20DE%201993.pdf, consultado en febrero de 2017.
17. The International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use (ICH). Q2(R1): Validation of analytical procedures: Text and methodology, November 2005. URL: https://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q2_R1/Step4/Q2_R1_Guideline.pdf, consultado en febrero de 2017.
18. US Food and Drug Administration, Guidance for Industry, Bioanalytical Method Validation, Center for Drug Evaluation and Research (CDER), September 2013. URL: <https://www.fda.gov/downloads/Drugs/Guidances/ucm368107.pdf>, consultado en febrero de 2017.
19. Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria, "Validación de métodos analíticos". Sección Catalana de AEFI. Comisión de normas de buena fabricación y control de la calidad, 1989, p. 23.
20. M. Valcárcel, A. Gómez, "Técnicas analíticas de separación", Reverte Eds., Barcelona, 1988, p. 330.

CÓMO CITAR ESTE ARTÍCULO

L.M. Sanabria, J.A. Martínez, Y. Baena, Validación de una metodología analítica por HPLC-DAD para la cuantificación de cafeína en un ensayo de permeación *in vitro* empleando mucosa oral porcina, *Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm.*, **46** (2), 202-219 (2017).

Vanillin Schiff bases: Molecular interactions in methanol and THF solutions

Shipra Baluja^{1*}, Jayesh Javiya¹

¹ Department of Chemistry, Saurashtra University, Rajkot-360005, (Gujarat), India.

* E-mail address: shipra_baluja@rediffmail.com

Received: May 4, 2017

Accepted: August 4, 2017

SUMMARY

Density, ultrasonic velocity and viscosity of some vanillin Schiff bases derivatives have been studied in methanol and tetrahydrofuran (THF) at 308.15 K. From the experimental data, various acoustical parameters such as isentropic compressibility (χ_s), Rao's molar sound function (R_m), Van der Waals constant (b), relaxation strength (r), intermolecular free length (L_f), apparent molar compressibility, etc. have been evaluated, which helps in understanding the molecular interactions occurring in these solutions.

Keywords: Vanillin Schiff bases, ultrasonic Study, acoustical parameters, methanol, THF.

RESUMEN

Bases de Schiff de vainillina: interacciones intermoleculares en soluciones de metanol y THF

En este trabajo se estudiaron la densidad, la velocidad ultrasónica y la viscosidad de soluciones de algunas bases de Schiff derivadas de la vainillina en metanol y tetrahidrofurano (THF) a 308,15 K. A partir de los datos experimentales, se evaluaron diversos parámetros acústicos, como la compresibilidad isentrópica (χ_s), la función acústica molar de Rao (R_m), la constante de Van der Waals (b), la fuerza de relajación (r), la longitud intermolecular libre (L_f), la compresibilidad molar aparente, etc., todo lo cual ayuda a comprender las interacciones moleculares que ocurren en estas soluciones.

Palabras clave: bases Schiff de vainilla, estudio ultrasónico, parámetros acústicos, metanol, THF.

INTRODUCTION

Ultrasonic velocity measurements have been used to study the nature of molecular interactions in various pure liquids [1-3], liquid mixtures [4-10] and in solutions [11-17]. However, little work has been done for some organic compound solutions [18-21] especially Schiff bases [22-25].

Some of these bases are known to possess a wide spectrum of biological activities and are used in pharmaceutical science [26-29]. The presence of different functional groups cause different type of interactions with different solvents which is an important parameter for the selection of these compounds as starting material, intermediate or product [30-32]. Further, binding or interaction of a compound or drug affects their pharmacokinetic and pharmacodynamic properties [33-35]. For the prediction of biological activities and transport phenomena also, physiochemical parameters are required [36, 37] and one of important parameter is interaction between solute and solvent molecules. The ultrasonic study is one of the non-destructive tools to study different types of interactions occurring in solutions [38, 39].

Thus, in present paper, acoustical properties of some vanillin Schiff bases are studied in methanol and THF over entire concentration range at 308.15 K. The results are interpreted in terms of molecular interactions occurring in the solution.

EXPERIMENTAL

The methanol and THF used in the present work were of AR grade and were purchased from Spectrochem Pvt. Ltd (Mumbai) and were purified according to the standard procedure [40]. The Schiff bases were synthesized in the laboratory and were recrystallized before use. The common structure of synthesized Schiff bases and their substitution groups (R) are given in Figure 1.

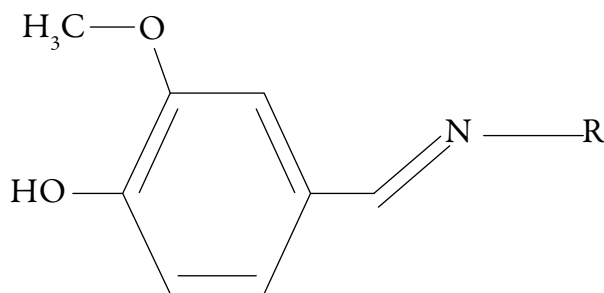


Figure 1. General structure of vanillin Schiff bases. R is: *SV-1*: 4-CH₃-C₆H₄; *SV-2*: 3-Cl-4-F-C₆H₃; *SV-3*: 3-OCH₃-C₆H₄; *SV-4*: 4-F-C₆H₄; *SV-5*: 2-CH₃-C₆H₄; *SV-6*: 2-Cl,5-Cl-C₆H₃; *SV-7*: -C₆H₅; *SV-8*: -C₅H₆N₃O-C₆H₅.

The densities, ultrasonic velocity and viscosity of pure solvents and their solutions were measured by single capillary pycnometer, single crystal variable path ultrasonic interferometer operating at 2 MHz (Mittal Enterprises) and Ubbelohde viscometer respectively. The accuracy of density, velocity and viscosity are $\pm 0.0001 \text{ g/cm}^3$, $\pm 0.1\%$ cm/sec and 0.05% respectively. All the measurements were carried out at 308.15 K. The uncertainty of temperature is $\pm 0.1 \text{ K}$ and that of concentration is 0.0001 mol/dm^3 .

RESULTS AND DISCUSSION

The experimental data of ultrasonic velocity, density and viscosity are given in Table 1.

Table 1. The density (ρ), ultrasonic velocity (U) and viscosity (η) of vanillin Schiff bases in methanol and THF at 308.15 K.

Conc. (M)	Density g.cm^{-3}	Velocity $\times 10^5 \text{ cm.s}^{-1}$	Viscosity $\times 10^3 \text{ poise}$	Density g.cm^{-3}	Velocity $\times 10^5 \text{ cm.s}^{-1}$	Viscosity $\times 10^3 \text{ poise}$
Methanol				THF		
SV-1						
0.01	0.7768	1.0848	5.0285	0.8784	1.2416	4.6053
0.02	0.7782	1.0872	5.0690	0.8797	1.2424	4.6492
0.04	0.7796	1.0896	5.1500	0.8806	1.2432	4.7259
0.06	0.7814	1.0936	5.3060	0.8815	1.2452	4.8505
0.08	0.7821	1.0956	5.3475	0.8819	1.2468	4.8898
0.10	0.7831	1.0972	5.4449	0.8829	1.2488	4.9811
SV-2						
0.01	0.7777	1.0812	5.0393	0.8802	1.2400	4.6205
0.02	0.7794	1.0836	5.0945	0.8811	1.2404	4.6715
0.04	0.7803	1.0852	5.1433	0.8815	1.2408	4.7150
0.06	0.7812	1.0872	5.2510	0.8823	1.2420	4.8178
0.08	0.7827	1.0884	5.5257	0.8830	1.2432	5.0659
0.10	0.7842	1.0912	5.7881	0.8839	1.2444	5.2920
SV-3						
0.01	0.7778	1.0860	5.1268	0.8810	1.2404	4.7237
0.02	0.7798	1.0880	5.2188	0.8821	1.2412	4.7960
0.04	0.7812	1.0916	5.2705	0.8824	1.2428	4.8390
0.06	0.7824	1.0960	5.3318	0.8827	1.2432	4.9114
0.08	0.7826	1.0996	5.4364	0.8830	1.2448	4.9923
0.10	0.7836	1.1032	5.5562	0.8838	1.2456	5.0969

(Continuous)

Table 1. The density (ρ), ultrasonic velocity (U) and viscosity (η) of vanillin Schiff bases in methanol and THF at 308.15 K (*continuation*).

Conc. (M)	Density g.cm^{-3}	Velocity $\times 10^{-5} \text{ cm.s}^{-1}$	Viscosity $\times 10^3 \text{ poise}$	Density g.cm^{-3}	Velocity $\times 10^{-5} \text{ cm.s}^{-1}$	Viscosity $\times 10^3 \text{ poise}$
Methanol				THF		
SV-4						
0.01	0.7773	1.0876	5.0361	0.8798	1.2400	4.6547
0.02	0.7781	1.0904	5.0853	0.8805	1.2404	4.6961
0.04	0.7787	1.0924	5.1283	0.8808	1.2412	4.7255
0.06	0.7798	1.0940	5.1835	0.8811	1.2424	4.8048
0.08	0.7824	1.0992	5.3084	0.8821	1.2428	4.9109
0.10	0.7826	1.1016	5.4395	0.8842	1.2468	5.0435
SV-5						
0.01	0.7764	1.0852	5.0121	0.8786	1.2400	4.5630
0.02	0.7778	1.0868	5.0299	0.8788	1.2407	4.6153
0.04	0.7785	1.0880	5.0836	0.8796	1.2412	4.6771
0.06	0.7793	1.0912	5.1197	0.8805	1.2420	4.7538
0.08	0.7807	1.0940	5.1977	0.8819	1.2424	4.8391
0.10	0.7815	1.0984	5.3029	0.8829	1.2436	4.9275
SV-6						
0.01	0.7769	1.0816	5.2271	0.8784	1.2420	4.8462
0.02	0.7790	1.0836	5.3855	0.8797	1.2432	4.9516
0.04	0.7804	1.0864	5.5234	0.8806	1.2444	5.0878
0.06	0.7853	1.0900	5.6686	0.8815	1.2469	5.1906
0.08	0.7873	1.0924	5.8021	0.8819	1.2476	5.2993
0.10	0.7885	1.0964	5.8862	0.8829	1.2500	5.3782
SV-7						
0.01	0.7774	1.0848	5.2455	0.8792	1.2396	4.8585
0.02	0.7784	1.0896	5.3631	0.8795	1.2408	4.9640
0.04	0.7789	1.0936	5.4466	0.8812	1.2420	5.0527
0.06	0.7806	1.0964	5.4995	0.8813	1.2432	5.0889
0.08	0.7815	1.0988	5.6108	0.8823	1.2448	5.1946
0.10	0.7819	1.1012	5.7490	0.8830	1.2476	5.3288

(Continuous)

Table 1. The density (ρ), ultrasonic velocity (U) and viscosity (η) of vanillin Schiff bases in methanol and THF at 308.15 K (*continuation*).

Conc. (M)	Density g.cm^{-3}	Velocity $\times 10^{-5} \text{ cm.s}^{-1}$	Viscosity $\times 10^3 \text{ poise}$	Density g.cm^{-3}	Velocity $\times 10^{-5} \text{ cm.s}^{-1}$	Viscosity $\times 10^3 \text{ poise}$
Methanol				THF		
SV-8						
0.01	0.7767	1.0852	5.2917	0.8795	1.2424	4.5791
0.02	0.7782	1.0904	5.4127	0.8812	1.2436	4.6357
0.04	0.7786	1.0948	5.4810	0.8817	1.2448	4.6997
0.06	0.7792	1.0972	5.5401	0.8824	1.2476	4.7862
0.08	0.7799	1.1004	5.6214	0.8831	1.2488	4.8664
0.10	0.7806	1.1036	5.7395	0.8839	1.2520	4.9724

From the experimental data, various acoustical parameters were calculated using equations reported earlier [41].

Figure 2 shows the variation of ultrasonic velocity (U) increases with concentration for all the compounds in methanol and THF. It is observed that ultrasonic velocity increases with concentration for all the compounds in both the solvents.

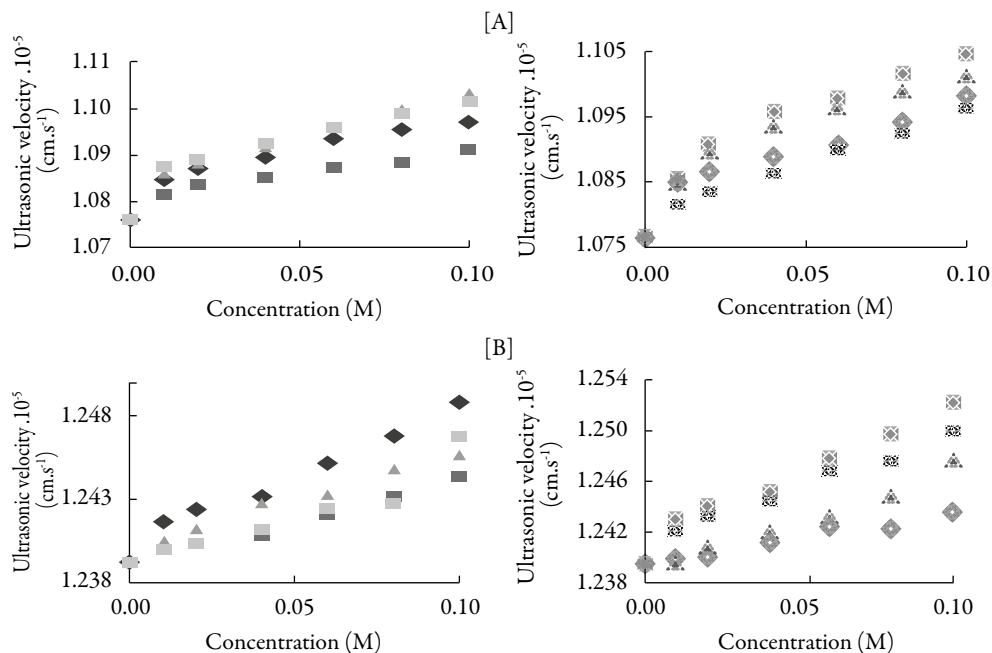


Figure 2. The variation of ultrasonic velocity with concentration in [A] methanol and [B] THF. \blacklozenge : SV-1, \blacksquare : SV-2, \blacktriangle : SV-3, \blacksquare : SV-4, \blacklozenge : SV-5, \boxtimes : SV-6, \blacktriangle : SV-7, \boxtimes : SV-8.

The velocity depends on intermolecular free length (L_f). Figure 3 show that L_f decreases continuously with concentration. Thus, intermolecular free length is reverse of velocity. In a solution, when the distance between molecules of solvent and compound decreases, L_f decreases which causes velocity to increase. The decrease in distance suggests interaction between solvent and compound molecules.

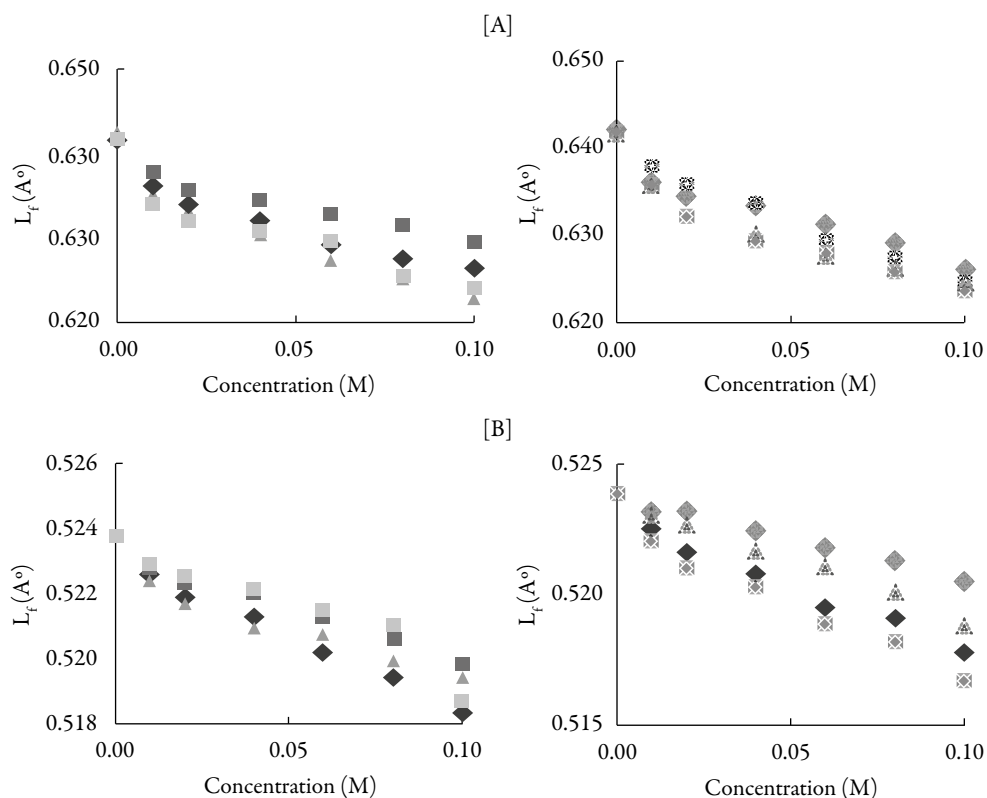


Figure 3. The variation of intermolecular free path length (L_f) with concentration in [A] methanol and [B] THF. \blacklozenge : SV-1, \blacksquare : SV-2, \blacktriangle : SV-3, \blacksquare : SV-4, \blacklozenge : SV-5, \boxtimes : SV-6, \blacktriangle : SV-7, \boxtimes : SV-8.

This is further supported by isentropic compressibility (κ_s) and relaxation strength (r). The variation of these two parameters with concentration of these compounds is also shown in Figures 4 and 5.

It is observed that both isentropic compressibility and relaxation strength decrease with concentration for all the compounds in both the solvents. The decrease of isentropic compressibility and relaxation strength with increasing concentration might be due to aggregation of solvent molecules around compound molecules which causes interaction between molecules of compound and solvent.

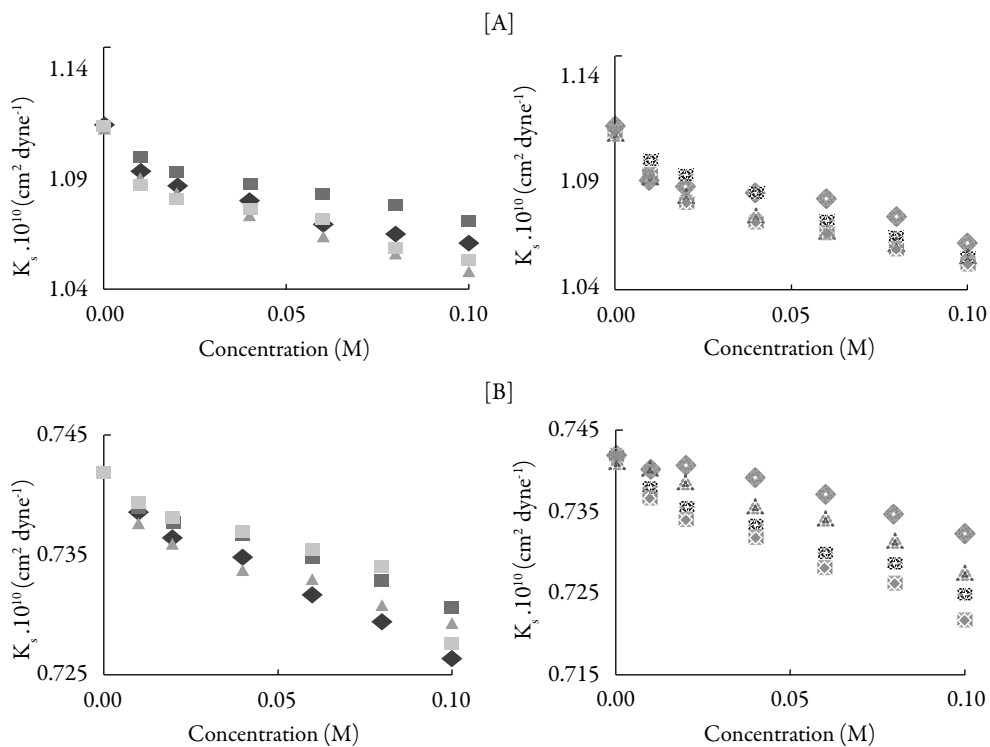


Figure 4. The variation of isentropic compressibility (κ_s) with concentration in [A] methanol and [B] THF. \blacklozenge : SV-1, \blacksquare : SV-2, \blacktriangle : SV-3, \blacksquare : SV-4, \blacklozenge : SV-5, \boxtimes : SV-6, \blacktriangle : SV-7, \boxtimes : SV-8.

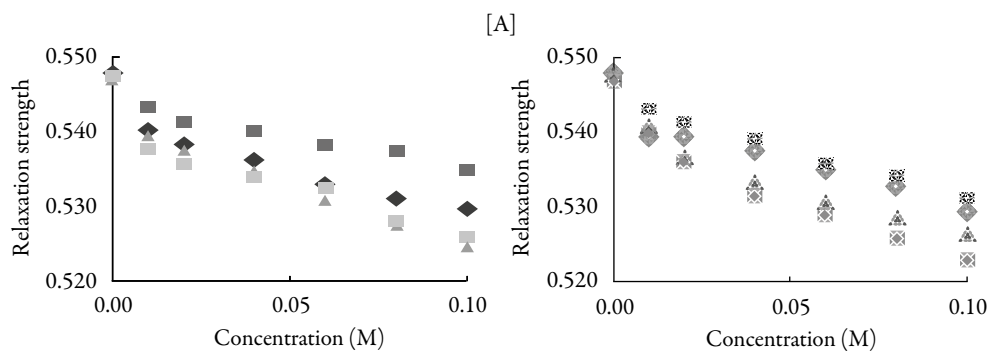


Figure 5. The variation of relaxation strength with concentration in [A] methanol and [B] THF. \blacklozenge : SV-1, \blacksquare : SV-2, \blacktriangle : SV-3, \blacksquare : SV-4, \blacklozenge : SV-5, \boxtimes : SV-6, \blacktriangle : SV-7, \boxtimes : SV-8. (Continuous)

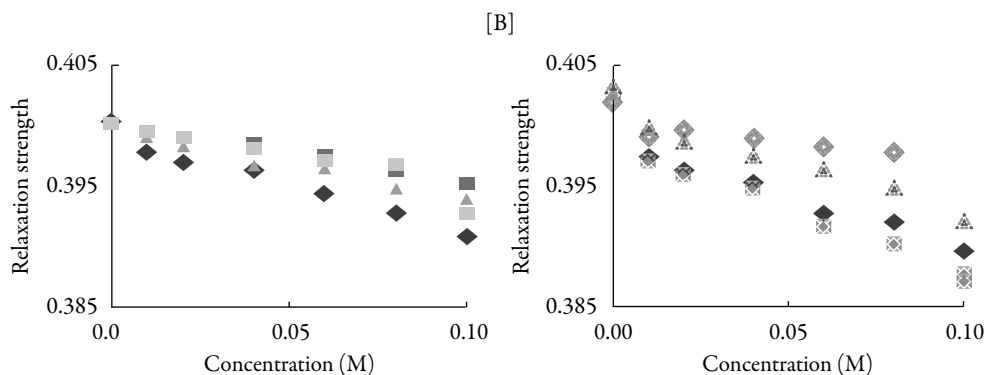


Figure 5. The variation of relaxation strength with concentration in [A] methanol and [B] THF (continuation). ◆: SV-1, ■: SV-2, ▲: SV-3, ●: SV-4, ◆: SV-5, ◻: SV-6, ▲: SV-7, ⊗: SV-8.

For all the compounds in both the solvents, Rao's molar sound function (R_m), molar compressibility (W) and Van der Waals' constant (b) vary linearly with concentration. Table 2 shows the correlation equation and correlation coefficient values for all these solutions. The linear change indicates that there is no complex formation in solution.

Table 2. The least-square Correlation equations and Correlation coefficients (γ) for compounds in methanol and THF at 303.15 K. C is the concentration.

Parameters	Correlation Equation	γ	Correlation equation	γ
	Methanol		THF	
SV-1				
$W \cdot 10^{-3} (cm^{-1} \cdot dyne^{-1})$	$2.2434 C + 1.0915$	0.9999	$1.3947 C + 2.3278$	0.9998
$R_m \cdot 10^{-3} (cm^{-8/3} \cdot s^{-1/3})$	$3.8495 C + 1.9647$	1	$2.4623 C + 4.1452$	0.9997
$b (cm^3 \cdot mol^{-1})$	$78.104 C + 41.244$	0.9999	$47.335 C + 83.125$	0.9996
SV-2				
$W \cdot 10^{-3} (cm^{-1} \cdot dyne^{-1})$	$2.921 C + 1.0901$	1	$1.978 C + 2.3253$	0.9996
$R_m \cdot 10^{-3} (cm^{-8/3} \cdot s^{-1/3})$	$5.2374 C + 1.9625$	1	$3.3422 C + 4.1541$	0.9812
$b (cm^3 \cdot mol^{-1})$	$108.01 C + 41.223$	0.9999	$68.89 C + 83.036$	0.9993
SV-3				
$W \cdot 10^{-3} (cm^{-1} \cdot dyne^{-1})$	$2.4878 C + 1.0898$	0.9999	$1.6347 C + 2.3238$	0.9985
$R_m \cdot 10^{-3} (cm^{-8/3} \cdot s^{-1/3})$	$4.4708 C + 1.962$	0.9999	$2.8892 C + 4.1369$	0.9979
$b (cm^3 \cdot mol^{-1})$	$90.274 C + 41.19$	0.9997	$49.312 C + 83.082$	0.9986

(Continuous)

Table 2. The least-square Correlation equations and Correlation coefficients (γ) for compounds in methanol and THF at 303.15 K (*continuation*).

Parameters	Correlation Equation	γ	Correlation equation	γ
	Methanol		THF	
SV-4				
$W \cdot 10^{-3} (cm^{-1} \cdot dyne^{-1})$	2.2434 C + 1.0915	0.9999	1.4368 C + 2.3262	0.9993
$R_m \cdot 10^{-3} (cm^{-8/3} \cdot s^{-1/3})$	4.307 C + 1.9594	0.9946	2.5345 C + 4.1419	0.9991
$b (cm^3 \cdot mol^{-1})$	81.488 C + 41.248	0.9999	49.312 C + 83.082	0.9986
SV-5				
$W \cdot 10^{-3} (cm^{-1} \cdot dyne^{-1})$	2.1744 C + 1.0911	1	1.3677 C + 2.3284	0.9999
$R_m \cdot 10^{-3} (cm^{-8/3} \cdot s^{-1/3})$	3.9085 C + 1.9649	0.9999	2.4071 C + 4.1465	0.9998
$b (cm^3 \cdot mol^{-1})$	79.365 C + 41.255	1	47.335 C + 83.125	0.9996
SV-6				
$W \cdot 10^{-3} (cm^{-1} \cdot dyne^{-1})$	3.229 C + 1.0916	0.9999	2.3194 C + 2.3281	0.9999
$R_m \cdot 10^{-3} (cm^{-8/3} \cdot s^{-1/3})$	5.7712 C + 1.9657	0.9998	4.1109 C + 4.1458	0.9999
$b (cm^3 \cdot mol^{-1})$	118.3 C + 41.3	0.9999	47.335 C + 83.125	0.9996
SV-7				
$W \cdot 10^{-3} (cm^{-1} \cdot dyne^{-1})$	2.4848 C + 1.0909	1	1.6207 C + 2.3266	0.9997
$R_m \cdot 10^{-3} (cm^{-8/3} \cdot s^{-1/3})$	4.4705 C + 1.9643	1	2.865 C + 4.1428	0.9996
$b (cm^3 \cdot mol^{-1})$	90.515 C + 41.227	0.9999	55.573 C + 83.101	0.9996
SV-8				
$W \cdot 10^{-3} (cm^{-1} \cdot dyne^{-1})$	4.5052 C + 1.0911	1	3.1409 C + 2.3263	0.9999
$R_m \cdot 10^{-3} (cm^{-8/3} \cdot s^{-1/3})$	8.1169 C + 1.9647	1	5.5731 C + 4.1422	0.9998
$b (cm^3 \cdot mol^{-1})$	166.23 C + 41.239	1	108.9 C + 83.056	0.9998

The type and magnitude of interactions in solution is further confirmed by apparent molar properties. The apparent molar compressibility's (ϕ_k) of the solutions is fitted to Gucker's relation [42].

$$\phi_k = \phi_k^o + S_k \sqrt{C}$$

From the plot of ϕ_k versus \sqrt{C} , ϕ_k^0 and S_k values are evaluated from the intercept and slope. The isentropic compressibility of all the solutions was also fitted to the following Bachem's relation [43]:

$$k_s = k_s^0 + AC + BC^{3/2}$$

The values of A and B were evaluated from the intercept and slope respectively. k_s^0 is the isentropic compressibility of pure solvent. All these values of intercept and slopes are given in Table 3.

Table 3. Constants A , B , ϕ_k^0 and S_k for vanillin Schiff bases in methanol and THF at 308.15 K.

Compound Code	$A \times 10^{11}$ $\text{dyn}^{-1} \cdot \text{cm}^3 \cdot \text{mol}^{-1}$	$B \times 10^{11}$ $\text{dyn}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1/2} \cdot \text{mol}^{3/2}$	$\phi_k^0 \times 10^8$ $\text{dyn}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$	$S_k \times 10^8$ $\text{dyn}^{-1} \text{cm}^{-3/2} \cdot \text{mol}^{3/2}$
Methanol				
SV-1	-13.70	30.0	-12.80	30.01
SV-2	-10.02	20.5	-9.54	28.01
SV-3	-15.20	26.6	-16.20	43.33
SV-4	-15.90	33.3	-14.02	61.53
SV-5	-11.20	20.5	-8.85	30.72
SV-6	-14.01	27.3	-13.21	32.05
SV-7	-17.40	38.0	-15.20	40.04
SV-8	-18.90	45.0	-16.80	32.25
THF				
SV-1	-4.25	10.0	-9.80	3.24
SV-2	-3.65	10.0	0.19	0.51
SV-3	-3.75	10.1	-2.82	10.6
SV-4	-3.25	10.0	-2.60	10.9
SV-5	-1.16	0.9	0.75	0.36
SV-6	-4.49	10.4	-3.24	12.1
SV-7	-1.71	1.0	-0.84	2.55
SV-8	-3.55	4.3	-2.52	1.01

Table 3 shows that in both solvents A and ϕ_k^0 values are negative or very low whereas B and S_k values are positive. The low or negative A and ϕ_k^0 values and positive B and S_k values suggest predominance of solute-solvent interactions.

CONCLUSIONS

It is concluded that in studied solutions of vanillin Schiff bases, compound-solvent interactions exist. This suggests that these compounds are more bonded to solvent and some modification is required so that it can easily be absorbed by the target.

DISCLOSURE STATEMENT

No potential conflict of interest was reported by the authors.

ACKNOWLEDGMENTS

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

REFERENCES

1. J. Nath, S.N. Dubey, Binary systems of trichloroethylene with benzene, toluene, p-xylene, carbon tetrachloride, and chloroform. Ultrasonic velocities and adiabatic compressibilities at 303.15 and 313.15 K and dielectric properties and refractive indexes at 303.15 K, *J. Phys. Chem.*, **84**, 2166 (1980).
2. C.M. Sehgal, Non-linear ultrasonics to determine molecular properties of pure liquids, *Ultrasonics*, **33**, 155 (1995).
3. M. Kalidoss, S. Ravi, New method of determining the structure factor of real liquids and their mixtures using ultrasonic velocity, *Statist. Mechan. Appl.*, **312**, 59 (2002).
4. G.N. Saha, B. Das, D.K. Hazra, Viscosities and excess molar volumes for acetonitrile + methanol at 298.15, 308.15, and 318.15 K, *J. Chem. Eng. Data*, **40**, 1264 (1995).
5. A. Ali, K. Tiwari, A.K Nain, V. Chakravarthy, Ultrasonic study of molecular interactions in ternary mixtures of dimethylsulphoxide (1) + carbon tetrachloride (2) + aromatic hydrocarbons (3) at 308.15 K, *Ind. J. Phys.*, **74**, 351 (2000).
6. P. Vasantharani, V. Pandiyan, A.N. Kannappan, Ultrasonic velocity, viscosity, density and excess properties of ternary mixture of N-methylcyclohexylamine+benzene+1-propanol, *Asian J. Appl. Sci.*, **2**, 169 (2009).

7. S.T. Awad, Ultrasonic studies of the crystallization behavior of two palm fats O/W emulsions and its modification, *Food Res. Int.*, **37**, 579 (2004).
8. V. Krishna, S. Sastry, Dielectric and thermodynamic studies on the hydrogen bonded binary system of isopropyl alcohol and aniline, *J. Solution Chem.*, **39**, 1377 (2010).
9. K.R. Reddy, G.S Rao, P.V.S. Sairam, P. Anila, C Rambabu, Study of molecular interactions in the binary liquid mixtures of NMP with alkoxyethanols, *J. Atoms Mol.*, **4**, 734 (2014).
10. J.D. Pandey, V. Sanguri, D.K. Dwivedi, K.K. Tiwari, Computation of isothermal compressibility, thermal expansivity and ultrasonic velocity of binary liquid mixtures using hole theory, *J. Mol. Liq.*, **135**, 65 (2007).
11. S. Rajagopalan, S.J. Sharma, Adiabatic compressibility and solvation studies of cellulose acetate in cyclohexanone and in carbon tetrachloride, *J. Pure. Appl. Ultra.*, **24**, 87 (2002).
12. D. Das, B. Das, D.K. Hazra, Ultrasonic velocities and isentropic compressibilities of some symmetrical tetra alkyl ammonium salts in N, N-dimethyl acetamide at 298.15 K, *J. Mol. Liq.*, **111**, 15 (2004).
13. J.D. Pandey, K. Mishara, A. Shukla, R.D. Rai, Ultrasonic and thermodynamic studies of tetracyclines in solutions, *Can. J. Chem.*, **65**, 303 (1987).
14. R. Hagen, R. Behrends, U. Kaatze, Acoustical properties of aqueous solutions of urea: Reference data for the ultrasonic spectrometry of liquids, *J. Chem. Eng. Data*, **49**, 988 (2004).
15. M. Hasan, D.F. Shirude, A.P. Hiray, U.B. Kadam, A.B. Sawant, Densities, viscosities and ultrasonic velocities of binary mixtures of methylbenzene with hexan-ol, heptan-ol and octan-ol at T = 298.15 and 308.15K, *Fluid Phase Equilib.*, **252**, 89 (2007).
16. V. Singh, P.K. Chhotaray, P.K. Banipal, T.S. Banipal, R.L. Gardas, Volumetric properties of amino acids in aqueous solutions of ammonium bases protic ionic liquids, *Fluid Phase Equilib.*, **385**, 258 (2015).
17. T.S. Banipal, D. Kaur, P.K. Banipal, G. Singh, Interactions of some peptides with sodium acetate and magnesium acetate in aqueous solutions at 298.15 K, *J. Mol. Liq.*, **140**, 54 (2008).

18. R. Kumar, R. Mahesh, B. Shanmugapriyan, V. Kannappan, Volumetric, viscometric, acoustic and refractometric studies of molecular interactions in certain binary systems of o-chlorophenol at 303.15 K, *Ind. J. Pure Appl. Phys.*, **50**, 633 (2012).
19. A.U. Mandakmare, M.L. Narwade, D.T. Tayade, A.B. Naik, Intermolecular interactions in dioxane-water solutions of substituted coumarins according to ultrasonic data, *Russ. J. Phys. Chem.*, **88**, 2334 (2014).
20. S.S. Aswale, S.R. Aswale, R.S. Hajare, Adiabatic compressibility, intermolecular free length and specific acoustic impedance of antibiotic ampicillin sodium, *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.*, **5**, 76 (2013).
21. S. Chauhan, K. Kumar, B.S. Patal, Study of acoustical parameters of proline in lecithin-ethanol mixture at varying temperature, *Ind. J. Pure Appl. Phys.*, **51**, 531 (2013).
22. S. Baluja, S. Oza, Ultrasonic studies of some derivatives of sulphonamide in dimethyl formamide, *Fluid Phase Equilib.*, **200**, 11 (2002).
23. S. Baluja, R. Bhalodia, Study of molecular interactions in solutions of azomethines of sulfamethoxazole in N, N-dimethyl formamide and tetrahydrofuran, *Russ. J. Phys. Chem. A*, **87**, 62 (2013).
24. S. Baluja, A. Shah, Acoustical studies of some derivatives of 4-amino antipyrine in 1,4-dioxane and dimethyl formamide at 318.15 K, *Fluid Phase Equilib.*, **215**, 55 (2004).
25. S. Baluja, P. Inamdar, M. Soni, Acoustical studies of some Schiff bases in 1,4 dioxane and dimethyl formamide at 308.15 K, *Acta Phys. Chim. Sinica*, **20**, 1104 (2004).
26. P. Przybylski, A. Huczynski, K. Pyta, B. Brzezinski, F. Bartl, Biological properties of Schiff bases and azo derivatives of phenols, *Curr. Org. Chem.*, **13**, 124 (2009).
27. C.M. Da Silva, D.L. Da Silva, L.V. Modolo, R.B. Alves, M.A. de Resende, C.V.B. Martins, A. de Fatima, Schiff bases: A short review of their anti-microbial activities, *J. Adv. Res.*, **2**, 1 (2011).
28. T.M. Tamer, K. Valachova, S.M. Mohyeldin, L. Soltes, Free radical scavenger activity of cinnamyl chitosan Schiff base, *J. Appl. Pharm. Sci.*, **6**, 130 (2016).
29. D.S. Kundariya, B.M. Bhesdadia, N.K. Joshi, P.K. Patel, Synthesis, characterization and pharmacological evaluation of some novel Schiff bases containing 1H-pyrazolo [3,4-b] pyridine moiety, *Int. J. ChemTech. Res. (USA)*, **3**, 238 (2011).

30. E. Benoist, J.F. Gestin, P. Blanchard, M. Jubault, J.P. Quintard, Spectroscopic and electrochemical studies of new copper (II) and nickel (II) tetradentate complexes of potential interest to nuclear medicine, *Trans. Metal Chem.*, **24**, 42 (1999).
31. J. Wang, Y. Song, X. Gao, Synthesis of amino antipyrine chromones Schiff base in ionic liquid, *Hech. Hua.*, **16**, 225 (2008).
32. V.V. Mulwad, J.M. Shirodkar, Synthesis and biological activity of some new Schiff bases, thiazolidinones and azetidinones of 4-hydroxy coumarin, *Ind. J. Heterocycl. Chem.*, **11**, 199 (2002).
33. N. Fathima, T. Mamatha, H.K. Qureshi, N. Anitha, J.V. Rao, Drug-exciipient interaction and its importance in dosage form development, *J. Appl. Pharm. Sci.*, **1**, 66 (2011).
34. P. Imming, C. Sinning, A. Meyer, Drugs, their targets and the nature and number of drug targets, *Nature Rev. Drug Disc.*, **5**, 821 (2006).
35. F. Poureshghi, P. Ghandfroushan, A. Safarnejad, S. Soltani, Interaction of an anti-epileptic drug, lamotrigine with human serum albumin (HSA): Application of spectroscopic techniques and molecular modeling methods, *J. Photochem. Photobiol. B: Biology*, **166**, 187 (2017).
36. D.E. Clark, Rapid calculation of polar molecular surface area and its application to the prediction of transport phenomena. 1. Prediction of intestinal absorption, *J. Pharm. Sci.*, **88**, 807 (1999).
37. T. Loftsson, M.E. Brewster, Pharmaceutical applications of cyclodextrins. 1. Drug solubilization and stabilization, *J. Pharm. Sci.*, **85**, 1017 (1996).
38. S. Thirumaran, D.M.C. Gardilya, Volumetric and ultrasonic studies on interionic interactions of some amino acids in aqueous magnesium acetate medium at 306.15 K, *Rec. Res. Sci. Tech.*, **3**, 56 (2011).
39. V. Natchimuthu, K.A. Jayalatha, S. Ravi, Characterizing the molecular interaction of perfluorocarbons with carbamazepine and benzodiazepine using photo- acoustic studies, *J. Mol. Liq.*, **218**, 120 (2016).
40. J.A. Riddick, W.B. Bunger, T. Sakano, "Organic solvents-physical properties and methods of purification", Fourth Edition, Techniques of Chemistry, II, A Wiley-Interscience Publication, John Wiley, New York, 1986.

41. K. Bhesaniya, S. Baluja, Molecular interactions in some synthesized pyrimidine derivatives in methanol and DMF solutions at 308.15 K, *J. Mol. Liq.*, **191**, 116 (2014).
42. F.T. Gucker, Jr., The apparent molal heat capacity, volume and compressibility of electrolytes, *Chem. Rev.*, **64**, 111 (1993).
43. C. Bachem, The compressibility of electrolytic solution, *Z. Electrochem.*, **41**, 570 (1935)

HOW TO CITE THIS ARTICLE

Sh. Baluja, J. Javiya, Vanillin Schiff bases: Molecular interactions in methanol and THF solutions, *Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm.*, **42** (2), 220-234 (2017)

Efecto de la fuerza de compresión sobre los atributos críticos de calidad en tabletas de liberación inmediata de furosemida

Juan Camilo Fonseca^{1*}, Paola Garzón López¹

¹ Maestría en Diseño y Gestión de Procesos, Universidad de La Sabana, Campus Puente del Común, Km. 7 Autopista Norte de Bogotá, Chía 250001, Colombia.

* Correo electrónico: juanfoac@unisabana.edu.co

Recibido para evaluación: 13 de junio de 2016

Aceptado para publicación: 14 de agosto de 2017

RESUMEN

La furosemida es un fármaco poco soluble en agua (0,01825 mg/mL). Debido a su baja solubilidad y baja permeabilidad, se ubica en la clase IV del Sistema de Clasificación Biofarmacéutica (BCS, por sus siglas en inglés). Se absorbe rápida pero incompletamente en el tracto gastrointestinal (GI). Actualmente, este fármaco se comercializa en tabletas, las que para su obtención deben ser sometidas a un proceso de compresión. La fuerza aplicada en dicha compresión puede influenciar algunas de las características de calidad del producto; por ello, la presente investigación estudia el efecto de la fuerza de compresión sobre los atributos críticos de calidad en el proceso de fabricación (dureza, friabilidad y desintegración) y en el producto terminado (uniformidad de dosificación y disolución) de comprimidos de furosemida. El efecto sobre la disolución se determinó por los factores de diferencia (f_1) y de similitud (f_2) de los perfiles de disolución y los parámetros de eficiencia de la disolución (ED) y tiempo medio de disolución (TMD), los cuales se calcularon con el software académico kinetDS[®]. Los resultados obtenidos permitieron definir el rango de la fuerza de compresión para el cual se obtuvo una ED superior al 85% y un TMD inferior a 7,5 min.

Palabras clave: furosemida, tabletas, proceso de compresión, fuerza de compresión, atributos críticos de calidad.

SUMMARY

Effect of compression force on critical quality attributes of immediate release tablets of furosemide

Furosemide is poorly water soluble drug (0.01825 mg/mL). Due to its low solubility and low permeability, it is labeled in class IV of the Biopharmaceutical Classification System (BCS). It is rapidly but incompletely absorbed from the gastrointestinal (GI) tract. Currently, this drug is marketed as tablets, which should be subjected to a compression process. The force applied in this compression can influence some of the quality characteristics of the product. Therefore, this investigation was carried out to determine the effect of compression force on the critical quality attributes of the product in process (hardness, friability and disintegration) and of the finished product (uniformity of dosage and dissolution). The effect on the dissolution was determined by the difference factor (f_1) and similarity factor (f_2) of the dissolution profiles, the dissolution efficiency (ED) and mean dissolution time (TMD) parameters, which were calculated by kinetDS® academic software. The results obtained allowed to define the range of compression force for which the ED was higher than 85% and the TMD lower than 7.5 min.

Key words: Furosemide, tablets, compression process, compression force, critical quality attributes.

INTRODUCCIÓN

La furosemida es un diurético ampliamente usado en forma de tabletas por vía oral. Se ha encontrado que durante la manufactura de los comprimidos de furosemida la fuerza de compresión provoca cambios significativos en la disolución del activo [1]. Estos inconvenientes se han atribuido principalmente a problemas de aglomeración y baja solubilidad del fármaco, razones por las cuales, evaluar el efecto que el proceso de compresión tiene sobre las características críticas de calidad de las tabletas, son una prioridad en su desarrollo y manufactura [2].

En la compresión, la fuerza y la velocidad de compactación son los parámetros principales del proceso [3]. La fuerza de compresión es el factor dominante, de manera tal que a medida que la fuerza incrementa, la resistencia a la tracción o ruptura (dureza) de la tableta aumenta y luego permanece constante o incluso decrece. El incremento de la fuerza de compresión puede causar laminación y “capping”, afectando también la friabilidad, el tiempo de desintegración y el perfil de disolución [3].

Por otro lado, en la medida que la velocidad del punzón se incrementa, disminuye su tiempo de permanencia en la matriz y aumenta la porosidad de las tabletas, la tendencia al “capping” y a la laminación. Con un incremento en la porosidad es de esperarse una caída de los tiempos de desintegración y de disolución, pero la interrelación entre la fuerza y la velocidad de compresión confunden el efecto [3, 4].

Para estudiar el proceso de compresión, en el modelo propuesto por la Administración de Medicamentos y Alimentos (FDA, por su sigla en inglés) de calidad por diseño QbD, se establece una guía para identificar los riesgos de mayor impacto en los atributos críticos de calidad de los comprimidos (tabla 1) [5].

Tabla 1. Ejemplo de la calificación del riesgo para el proceso de compresión de tabletas de liberación inmediata.

Factor	Atributo de calidad	Valoración del riesgo	Justificación
Velocidad del alimentador	Uniformidad de contenido	Alto	Velocidades por debajo de la óptima pueden causar llenado inconsistente de la matriz.
	Disolución	Alto	Velocidades de alimentación por encima de la óptima pueden causar sobrelubricación.
Fuerza de pre-compresión	Disolución	Medio	Fuerzas de pre-compresión por encima de la óptima pueden causar laminación de la tableta. Fuerzas inferiores a la óptima pueden causar atrapamiento de aire y provocar el “capping”.
Fuerza de compresión principal	Dureza y friabilidad	Alto	Fuerzas de compresión por debajo de la óptima pueden afectar la dureza y la friabilidad.
	Desintegración	Alto	Fuerzas de compresión por encima de la óptima pueden retardar el tiempo de desintegración.
	Disolución	Alto	Fuerzas de compresión por encima o por debajo de la óptima pueden afectar la disolución.
Velocidad de la tableteadora (tiempo de permanencia del punzón)	Dureza, friabilidad, desintegración, uniformidad de contenido y disolución	Bajo	Velocidades superiores a la óptima pueden causar inconsistencia en el llenado de la matriz, variabilidad de peso, lo cual impacta de manera indirecta en la dureza, la friabilidad, la uniformidad de contenido y en la disolución.

El impacto de estos riesgos identificados se puede evaluar, en gran parte, por las pruebas especificadas en la USP 38 [6]. Sin embargo, debido a la criticidad de la disolución en el desempeño del producto, la prueba de disolución de punto único establecida en la monografía puede ser adecuada solo para asegurar que no hay cambios de calidad y rendimiento en el producto, pero para evaluar y detectar cambios más importantes, se recomienda una comparación de perfiles de disolución realizada bajo condiciones idénticas para el producto antes y después del cambio [7-9].

Los perfiles de disolución pueden considerarse similares, teniendo en cuenta la similitud global del perfil y la similitud en cada punto temporal de disolución de la muestra. Para establecer dicha similitud, se utilizan los factores de diferencia (f_1) y de similitud (f_2) [8]. Además, es posible comparar la disolución obtenida a los mismos tiempos con diferentes formulaciones o condiciones de proceso por medio de los parámetros de eficiencia y tiempo medio de disolución [10].

Entendiéndose entonces la eficiencia de la disolución (ED) como el porcentaje del área del rectángulo descrito por el 100% de fármaco disuelto y el tiempo requerido para alcanzar dicha disolución [10], la ED tiene la ventaja de sumar los datos de liberación del principio activo y puede ser relacionada con los datos *in vivo* [11]. Este parámetro está definido por la siguiente ecuación:

$$ED = \frac{\int_0^t y dt}{Y_{100}t} * 100$$

Donde:

ED= área bajo la curva de disolución entre el tiempo cero y el tiempo (t), expresada como un porcentaje de la curva de máxima disolución, Y_{100} , sobre el mismo período de tiempo.

Y = porcentaje de fármaco disuelto.

t = período de tiempo en el cual se evalúa la disolución.

Por su parte, el tiempo medio de disolución (TMD) se define como el tiempo en el cual se disuelve el 50% del fármaco contenido en la tableta [11]. El TMD se calcula de la curva acumulativa de activo disuelto en función del tiempo:

$$TMD = \frac{\Sigma(t_i \Delta Q_i)}{Q_\infty}$$

Donde:

t_i = tiempo intermedio de los intervalos de tiempo de muestreo.

ΔQ_i = incremento de la cantidad de fármaco disuelto en cada intervalo t considerado.

Q_∞ = máxima cantidad de fármaco disuelto.

Los resultados de la ED y del TMD en diferentes formulaciones o condiciones de fabricación pueden ser comparados usando como referencia una prueba t de Student para las dos variables.

Siguiendo lo indicado por la FDA [5] y utilizando estos parámetros como criterio de comparación, el presente trabajo estudia la fuerza de compresión como uno de los factores calificado con alto impacto en los atributos críticos de calidad del producto. Se evaluaron todas las características críticas de calidad de las tabletas en las diferentes condiciones de estudio y se determinaron los factores de diferencia (f_1), similitud (f_2), la ED y el TMD de las tabletas obtenidas [8-10].

Los ensayos se realizaron en una tableteadora instrumentada que permite fijar y controlar la fuerza aplicada en las etapas de pre-compresión y compresión y, de esta forma, establecer un rango de operación que dé viabilidad al proceso por vía seca.

METODOLOGÍA

Elaboración y caracterización de la mezcla

Para el estudio se empleó la forma I (polimorfo) de furosemida, suministrada por la empresa Allianz Group del fabricante IPCA Laboratories. La formulación utilizada se describe en la tabla 2 y se seleccionaron, tomando como referencia, los resultados obtenidos para mejorar la disolución de este activo con coprocesados de lactosa monohidrato, polivinil pirrolidona y crospovidona [2, 12]. Esta formulación evita el empleo de desintegrantes a altas concentraciones ($\geq 5\%$) o la preparación de dispersiones sólidas, que resultan métodos costosos y complejos frente a la compresión directa que es la primera elección a escala industrial [13-16].

Se pesaron las cantidades indicadas de furosemida y de excipientes indicadas en la tabla 2.

De manera independiente, las cantidades de furosemida y Ludipress® pesadas se pasaron a través de un tamiz No. 20 y se adicionaron a un mezclador de cintas marca Stokes (Ribbon Blender, fabricado en Filadelfia, EE. UU.) con capacidad de 20 kg. Se hizo la mezcla de los ingredientes por un tiempo de 15 min.

Tabla 2. Formulación furosemida en tabletas al 20%.

Materia prima	Porcentaje (%)	Cantidad (g)
Furosemida	20	3000
Ludipress® como coprocesado compuesto de Lactosa monohidrato 93% Polivinil pirrolidona 3,5% Crospovidona 3,5%	78	11700
Estearato de magnesio	2	240
Total	100	15000

Para la lubricación de la mezcla se adicionó al mezclador la cantidad de estearato de magnesio pesada, pasándola previamente por un tamiz de malla No. 20. El lubricante se incorporó mezclando durante 5 min.

Uniformidad de mezcla

La distribución homogénea de la furosemida se determinó tomando una muestra de 5 g en 5 puntos del mezclador. La cuantificación del activo se realizó por cromatografía líquida de alta eficiencia según USP 38 [6] en un cromatógrafo marca Waters, modelo Alliance 2695 con detector UV.

Para la corrida se utilizó como fase móvil una mezcla de 600 mL de agua, 400 mL de tetrahidrofurano y 1 mL de ácido acético glacial y como diluyente una solución en partes iguales de agua-acetonitrilo. Se empleó una columna RP18 5,0 μ m LiChrospher 100 (250-4), a un flujo de 1,00 μ L/min, con una temperatura en la columna de 17 ± 5 °C. El volumen de inyección de la muestra fue de 50 μ L para un tiempo de retención del analito de 6,8 min \pm 10% a una longitud de onda de 254 nm.

La técnica analítica fue validada para las condiciones cromatográficas mencionadas anteriormente en cuanto a especificidad, exactitud (promedio recuperación: 99,28%), precisión (RSD: 0,55%) y linealidad ($y = 61077,64x - 49337,58$; $r^2 = 0,99982$).

Compresión de la mezcla

La mezcla de furosemida con los excipientes se dividió en tres porciones iguales de 4,5 kg, siendo esta la cantidad de mezcla requerida en las tolvas de la tableteadora para hacer la compresión.

Para realizar la compresión de cada fracción de la mezcla, se programó el equipo para trabajar a una velocidad de 50 rpm en la torreta, a diferentes fuerzas de compresión. Se empleó una tableteadora Sejong Pharmatech, MRC-S instrumentada que controla, mide y registra la distancia entre los punzones. La cantidad de polvo comprimido se

sometió a la misma fuerza de compresión fijando la distancia entre los rodillos de compresión y garantizando el peso uniforme de los comprimidos [17-19]. El controlador lógico programable (PLC) del equipo permitió ajustar la fuerza de compresión en el rango de 0,9 a 25,5 kN. La compresión se hizo con punzones de acero inoxidable, circulares, con cara plana, de 6,0 mm de diámetro.

Se tomaron muestras representativas de las tabletas (500 en cada caso) obtenidas al inicio, mitad y final de la compresión a diferente fuerza de compresión (8 niveles), se mantuvieron en condiciones controladas de humedad (50-60%HR) y temperatura (entre 15 y 20 °C) en el cubículo de compresión y se realizaron las pruebas físicas de dureza, friabilidad y desintegración [20]. Con estas variables se hizo la selección de los niveles de compresión en los cuales las tabletas cumplieron satisfactoria y simultáneamente los criterios en las tres pruebas [21]. Estos comprimidos se analizaron con respecto al contenido de principio activo y uniformidad del mismo y se compararon por medio del comportamiento de disolución [22].

Pruebas físicas

Determinación de la dureza

Se colocó cada comprimido entre las dos mordazas de un durómetro Vanderkamp VK200 y se aumentó la presión hasta la ruptura de la tableta. La medición se realizó sobre diez comprimidos obtenidos en cada condición de compresión y el resultado se reportó como el valor promedio obtenido en cada caso. La prueba se hizo en comprimidos recién fabricados y se realizó seguimiento a la dureza en un período de 48 h. En el período de seguimiento, las tabletas se almacenaron en condiciones controladas (humedad 50-60%HR).

Friabilidad

Se tomó una muestra de 10 comprimidos previamente pesados, y se colocó en el tambor de un friabilizador Vankel FRIABI4. Se programó para rotar el tambor 100 veces. Una vez el friabilizador finalizó los ciclos, se observó la integridad de las tabletas y se procedió a pesarlas. La prueba se realizó por triplicado en cada condición de compresión y si se observaban partículas de polvo, estas se eliminaban con ayuda del aire comprimido antes de pesar. Se considera aceptable una pérdida de peso inferior al 1% [6].

Prueba de desintegración

Se depositó una tableta en cada uno de los 6 tubos de la canastilla de un desintegrador Hanson Research QC 21. Se colocó un disco sobre cada comprimido y se sumergió la canastilla en agua a 37 ± 2 °C. Una vez puesto el equipo en operación, se registró el tiempo necesario para la completa desintegración de las 6 tabletas. La prueba se hizo por triplicado en cada condición de compresión.

Pruebas químicas

Se determinó el contenido de furosemida en los comprimidos con la técnica validada, se calculó la uniformidad de dosis de acuerdo con lo indicado en la USP 38 y se verificó que las tabletas cumplan con los criterios de valoración establecidos en dicha farmacopea, previo a realizar la prueba de disolución [6].

Pruebas de desempeño

Evaluación del comportamiento de la disolución in vitro

Se tomaron muestras de 6 tabletas obtenidas en cada una de las condiciones de compresión y se procedió a evaluar la disolución en un disolutor con paletas, automuestreador y celda para la lectura directa de las muestras al ultravioleta (Vankel VK700).

Como medio de disolución, se empleó solución amortiguadora de fosfato de pH 5,8, a 50 rpm por 60 min a una temperatura de $37 \pm 0,5$ °C; condiciones definidas en la USP 38 [6]. Se tomó una alícuota del medio de disolución a intervalos de 5 min durante 1 h (12 en total); la toma de la muestra y filtración de esta se trabajó en modo automático. Se utilizaron filtros de cánula de 35 μ m marca Varían. El método analítico para la cuantificación de furosemida por espectrofotometría al UV en este medio de disolución se validó previamente, demostrando el cumplimiento de los criterios de especificidad, linealidad ($y = 0,01x + 0,0012$; $r^2 = 0,9978$), precisión (RSD: 0,45%) y exactitud (promedio de recuperación: 101,7%).

Con los datos de concentración de activo liberado en función del tiempo se elaboraron los perfiles de disolución para cada una de las tabletas evaluadas.

Comparación de los perfiles de disolución

Los perfiles de disolución de las tabletas obtenidas a diferentes condiciones de fuerza de compresión se compararon mediante el método del modelo independiente, calculando el factor de diferencia (f_1) y el factor de similitud (f_2) [8]. Igualmente, se realizaron comparaciones de la ED y del TMD para cada perfil mediante la prueba t utilizando un nivel de confianza del 95%.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Uniformidad de la mezcla

La uniformidad de la mezcla entre los puntos muestreados se calculó por medio de la desviación estándar relativa (RSD) y se encontró un valor del 2,5%. El contenido (promedio) de activo en la mezcla se encontró entre 90%-110% y todos los resultados individuales en el rango del 75% al 125% de la cantidad esperada (tabla 3). Lo anterior

indica una adecuada distribución del activo en la mezcla y la posibilidad de continuar con la compresión.

Tabla 3. Uniformidad de la mezcla.

Punto mezclador	1	2	3	4	5	Promedio (%)	RSD (%)
Contenido de furosemida (%)	101,5	102,9	97,6	99,7	97,1	98,9	2,5

Compresión de la mezcla

Fuerza de compresión

Utilizando el PLC de la tableteadora, se fijó la fuerza en las etapas de pre-compresión y de compresión en cada caso, para obtener los valores reportados (tabla 4). De manera independiente, se determinó la dureza promedio de 10 comprimidos en cada condición (tabla 4).

Tabla 4. Ajuste de fuerza en pre-compresión y compresión.

Etapa de pre-compresión			Etapa de compresión				Dureza promedio inicial de las tabletas (kg-f)
Penetración del punzón inferior (mm)	Penetración del punzón superior (mm)	Fuerza de pre-compresión	Penetración del punzón superior (mm)	Distancia de penetración del punzón inferior (mm)	Fuerza de compresión		
					(kg-f)	(kN)	
6,73	0,89	160-200 kg-f	0,5	5,54 ± 0,02	95 ± 5	0,9	0,9 ± 0,1
			0,5	5,13 ± 0,02	417 ± 5	4,0	2,9 ± 0,1
			0,5	4,63 ± 0,02	650 ± 5	6,3	6,0 ± 0,1
			0,5	4,54 ± 0,02	761 ± 5	7,5	7,0 ± 0,1
			0,5	4,35 ± 0,02	1.050 ± 5	10,3	10,0 ± 0,1
			0,5	4,11 ± 0,02	1.685 ± 5	16,5	16,5 ± 0,1
			0,5	3,95 ± 0,02	2.050 ± 5	20,1	20,0 ± 0,1
			0,5	3,73 ± 0,02	2.600 ± 5	25,5	25,5 ± 0,1

Con estos datos se obtuvieron las gráficas de la dureza promedio de las tabletas en función de la distancia de penetración del punzón (figura 1) y de la dureza promedio de las tabletas en función de la fuerza de compresión principal (figura 2).

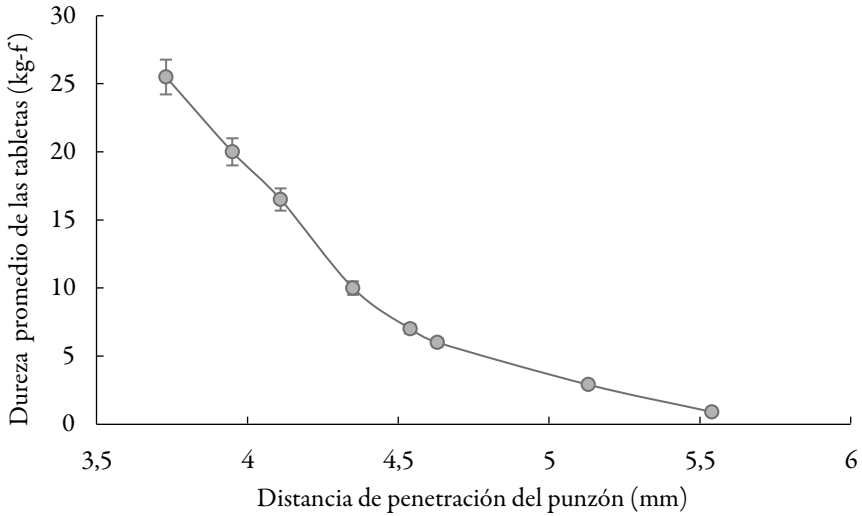


Figura 1. Dureza de las tabletas en función de la distancia de penetración del punzón.

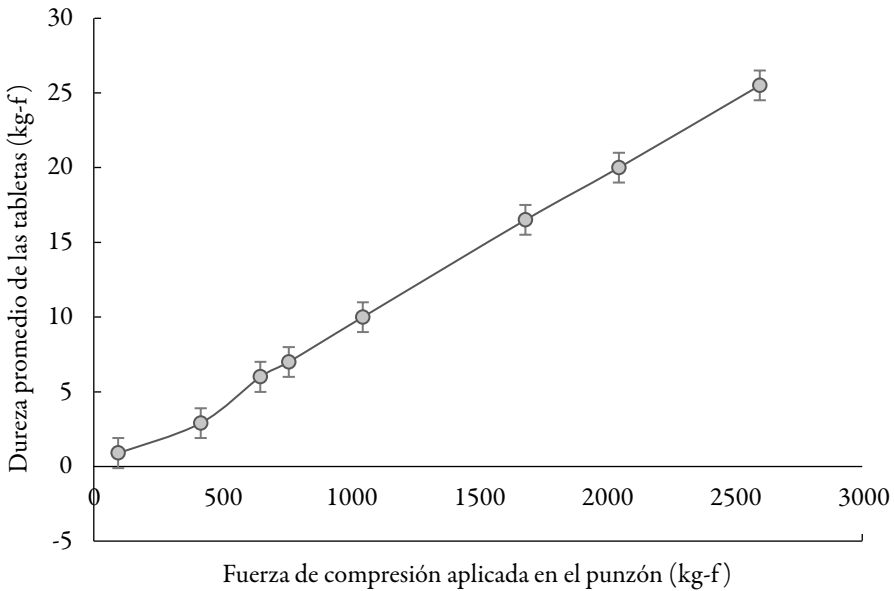


Figura 2. Dureza de las tabletas en función de la fuerza de compresión aplicada por el punzón en la etapa de compresión.

Se encontró una relación directa entre la fuerza de compresión aplicada en el punzón y la dureza promedio obtenida en las tabletas (figura 2). Este comportamiento facilita el control del proceso, ya que, al existir dicha proporcionalidad entre fuerza y dureza, la tableteadora puede garantizar la reproducibilidad de los resultados en el proceso de compresión [12, 17].

Se obtuvieron los siguientes resultados en las pruebas realizadas a las tabletas obtenidas a diferentes fuerzas de compresión:

Pruebas físicas

Dureza

Se realizó la medición de la dureza de las tabletas recién comprimidas y a las 48 h se observó un incremento en el valor obtenido inicialmente. Transcurridos 2 días la dureza de las tabletas se estabilizó. El incremento (%) en la dureza de los comprimidos se presenta en la figura 3. Para el rango de estudio, dicha variación está en el orden del 3% al 22% de la dureza inicial. Este fenómeno se observa con relativa frecuencia y se sabe que está influenciado por factores como la pérdida o ganancia de humedad, la deformación plástica y el reordenamiento de las partículas al interior del comprimido luego de la consolidación [23].

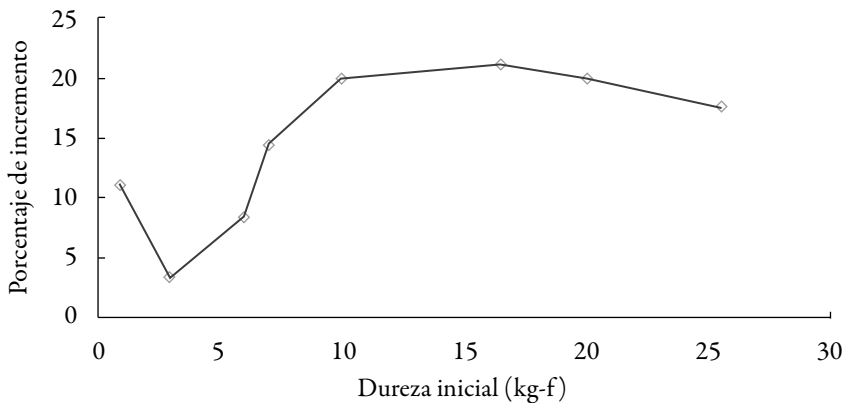


Figura 3. Incremento en la dureza de las tabletas (48 h después).

Las variaciones en la dureza de las tabletas en las etapas pos-compresión pueden atribuirse a atracciones entre las partículas o cambios en estas al interior del comprimido [24]. Se han propuesto tres principales explicaciones mecanicistas: reorganización del material sólido en la superficie de las partículas dentro de la tableta, deformación continua de las partículas después de la compactación y cristalización del material disuelto entre partículas vecinas debido al movimiento del agua dentro de la tableta [25, 26].

En el presente estudio, los resultados muestran que el incremento en la dureza fue mayor en la medida que aumentó la fuerza de compresión en tabletas con durezas entre 3 y 10 kg-f, se estabiliza en tabletas con durezas entre 10 y 20 kg-f y es menor en comprimidos con durezas superiores a dicho valor.

A medida que el contenido de humedad en la tableta se incrementa, la dureza de las tabletas también aumenta (de manera especial a bajos contenidos de humedad), alcanza un máximo, y luego decrece (específicamente con altos contenidos de humedad) [24]. Debido a que el efecto de la humedad del ambiente es mayor cuando las tabletas se obtienen por compresión directa, fue necesario controlar estrictamente las condiciones de almacenamiento de los comprimidos a granel hasta el envasado hermético de los mismos [26].

Friabilidad

En la figura 4 se reportan los resultados obtenidos al evaluar la friabilidad de las tabletas obtenidas a los diferentes niveles de fuerza de compresión investigados.

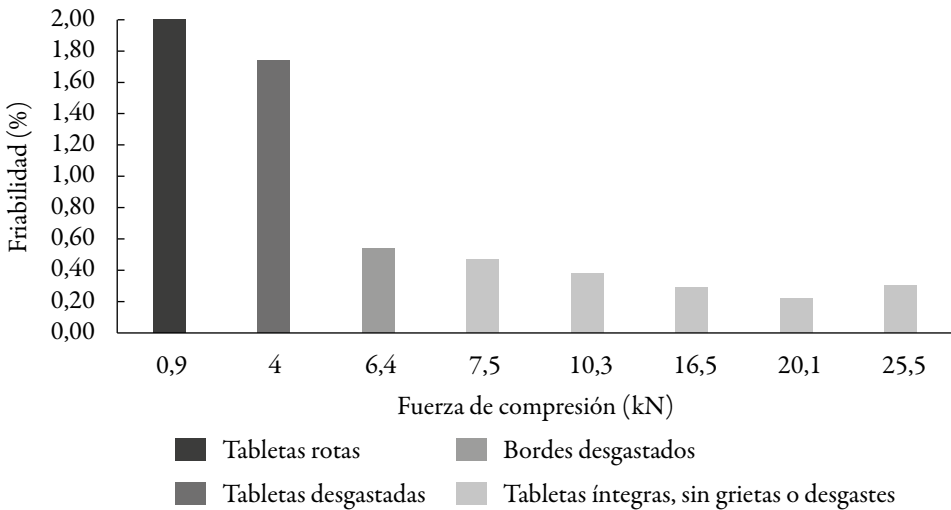


Figura 4. Relación de la friabilidad con la fuerza de compresión aplicada.

Para garantizar la integridad de las tabletas en el proceso de envase, empaque, transporte y almacenamiento y de acuerdo con los resultados obtenidos, se decide que la dureza de los comprimidos debe ser igual o superior a los 8 kg-f, ya que las tabletas con durezas inferiores presentarán problemas de friabilidad como desgaste y ruptura. Este valor de dureza se alcanza con fuerzas de compresión iguales o superiores a 7,5 kN.

Desintegración

Se realizó la prueba de desintegración a las tabletas obtenidas con fuerzas de compresión en el rango de 7,5 a 25,5 kN. Los resultados se presentan en la figura 5.

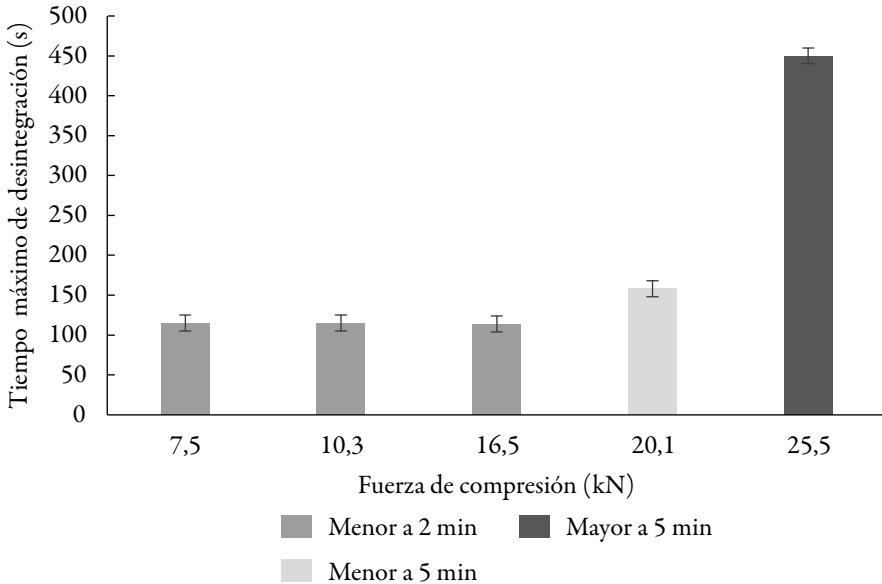


Figura 5. Relación de la dureza y el tiempo máximo de desintegración de las tabletas.

Para comprimidos obtenidos a fuerzas de compresión iguales o superiores a los 20,1 kN, se observó que la presión aplicada por el punzón retarda el efecto desintegrante de la crosprovidona. A mayor fuerza de compresión, el punzón penetra más en la matriz, desplaza mayor cantidad de aire y reduce la porosidad de la tableta, dificultando la penetración del agua y el hinchamiento del comprimido [13, 27]. De esta forma, las tabletas no se desintegran como tal, sino que se erosionan lentamente formando aros, tal como se presenta en la figura 6. La formación de dichos aros está relacionada con la distribución de la fuerza aplicada al interior de la matriz y la densificación del polvo en el comprimido [28].

Teniendo en cuenta que las tabletas obtenidas a fuerzas de compresión iguales o superiores a los 20,1 kN presentaron tiempos de desintegración mayores a 2 min, se considera conveniente acotar el parámetro de fuerza de compresión a 16,5 kN, con objeto de favorecer una rápida desintegración de la tableta y asegurar la menor variabilidad en los resultados. De esta forma, se establece como criterio para la dureza de las tabletas un rango entre 8 y 20 kg-f.



Figura 6. Formación de aros en la prueba de desintegración.

Pruebas químicas

Los resultados del contenido y la uniformidad de dosis de los comprimidos de furosemina se presentan en la tabla 5 y evidencian el cumplimiento de los criterios establecidos en la USP 38 [6]. Los resultados se consideran satisfactorios para continuar con las pruebas de disolución.

Tabla 5. Contenido de furosemina en comprimidos obtenidos, según la fuerza de compresión.

Fuerza de compresión (kN)	Dureza (kg-f)	Contenido de furosemina (%)	Uniformidad de dosis (L)
7,5	8,0 ± 0,1	101,2	4,2
10,3	12,0 ± 0,1	100,1	3,7
16,5	20,0 ± 0,1	98,6	4,3

Pruebas de desempeño

Para evaluar el efecto de la fuerza de compresión en la disolución *in vitro* del principio activo, se tomaron muestras de las tabletas obtenidas con fuerzas de compresión de 7,5 kN, 10,3 kN y 16,5 kN y se realizaron los correspondientes perfiles de disolución. La tabla 6 resume los resultados obtenidos en cada tiempo de muestreo y el coeficiente de variación asociado a la medición realizada en los 6 vasos del disolutor.

Tabla 6. Furosemida liberada (%) en tabletas obtenidas a diferentes fuerzas de compresión.

*	Tiempo de disolución (min)												Fuerza de compresión
	5	10	15	20	25	30	35	40	45	50	55	60	
% F	54,6	84,6	94,9	98,1	99,1	99,8	97,9	97,9	97,9	98,0	98,2	98,2	7,5 kN
CV	14,18	2,51	0,92	0,78	0,90	0,99	0,98	1,07	1,06	1,09	1,09	1,12	
% F	58,9	83,8	93,8	95,1	98,1	98,5	98,9	99,1	99,3	99,5	99,6	99,8	10,3 kN
CV	10,26	2,77	1,59	2,16	1,47	1,32	1,26	1,30	1,28	1,29	1,29	1,24	
% F	45,2	83,5	95,9	99,7	101,0	102,3	102,4	102,5	102,5	102,6	102,6	102,7	16,5 kN
CV	12,23	4,46	2,21	1,41	1,46	1,82	1,75	1,74	1,72	1,71	1,68	1,71	

* % F: porcentaje de furosemida disuelta, CV: coeficiente de variación.

La cantidad de fármaco disuelto es superior a 80% en los primeros 10 min de la disolución (tabla 6). Además, se observa que la mayor dispersión de los datos se presenta en los primeros minutos, donde el proceso de desintegración se lleva a cabo, es decir, la velocidad de disolución está influenciada por el desintegrante (crospovidona) de la formulación [13, 15].

Comparación de los perfiles de disolución a diferentes fuerzas de compresión

Para el análisis se utilizaron como referencia los datos de disolución de las tabletas obtenidas en el nivel intermedio de fuerza de compresión (10,3 kN) y se compararon con el nivel inferior (7,5 kN) y el superior (16,5 kN), calculando los factores de diferencia (f_1) y de similitud (f_2). Así, se determinó la significancia del efecto de la fuerza de compresión en cada una de las condiciones de estudio. En la tabla 7 se presentan los resultados.

El factor de diferencia es menor a 2,0 cuando se comparan las tabletas obtenidas a 7,5 kN y 16,5 kN frente a las de 10,3 kN, lo que confirma que no se detecta diferencia significativa entre las tabletas obtenidas a fuerzas de compresión entre los 7,5 kN y 16,5 kN. Asimismo, al comparar los factores de similitud (83,22 y 64,74), es posible afirmar que los perfiles de liberación para las tabletas obtenidas en los tres niveles de fuerza de compresión son equivalentes. Por lo anterior, dicho rango de compresión se fija como parámetro para controlar el proceso.

Se considera que el buen desempeño de las tabletas en las condiciones de operación definidas, se logró por las propiedades de compresibilidad y desintegración de la formulación utilizada. Gracias a la compresibilidad de la mezcla, se presentó un incremento lineal en la dureza de las tabletas con la fuerza de compresión aplicada (7,5 kN a 16,5 kN). En estas condiciones se obtuvieron comprimidos con baja friabilidad que

tendrían la porosidad suficiente para permitir la permeación del agua y la desintegración. El rápido efecto desintegrante se atribuye a la capacidad de hinchamiento de la crospovidona al entrar en contacto con el agua [15].

Tabla 7. Comparación de los perfiles de disolución para tabletas de furosemida obtenidas con diferente fuerza de compresión.

Fuerza de compresión aplicada	Prueba	Especificación	Resultado	Concepto (diferencia significativa)
7,5 kN vs. 10,3 kN	Factor de diferencia (f_1)	0 – 15	0,47	No
	Factor de similitud (f_2)	50 – 100	83,22	
16,5 kN vs. 10,3 kN	Factor de diferencia (f_1)	0 – 15	1,63	No
	Factor de similitud (f_2)	50 – 100	64,74	

ED y TMD

El análisis de los perfiles de disolución con el software KinetDS® permitió determinar la eficiencia y el tiempo medio de disolución de la furosemida en los comprimidos obtenidos.

La ED se calculó a las diferentes fuerzas de compresión y los resultados se presentan en la tabla 8. La ED fue superior al 85% en todos los casos con un TMD comprendido en el rango entre 5,0 y 7,0 min.

Al realizar la comparación de las medias de las ED y los TMD por medio de la prueba de hipótesis, se pudo demostrar que no se detecta diferencia estadísticamente significativa entre estos parámetros.

De acuerdo con los resultados obtenidos en las pruebas de desintegración y disolución, se puede inferir que controlando la fuerza de compresión y la dureza de las tabletas durante el proceso, se pueden obtener comprimidos que satisfagan los criterios de aceptación y así alcanzar con seguridad la liberación del activo.

De la misma forma, con la formulación utilizada se logró que la disolución de las tabletas de furosemida no resultara afectada de manera significativa por la fuerza de compresión y fue posible definir un espacio de diseño para el proceso que asegura la liberación del fármaco dentro de los criterios de aceptación establecidos por la USP 38 [6].

Tabla 8. Comparación de las medias de las ED y los TMD a diferentes fuerzas de compresión.

Fuerza de compresión – 7,5 kN vs. 10,3 kN									
Fuerza de compresión (kN)	ED PROM (%)	Desviación estándar (%)	t_{tab}	t_{exp}	Resultado	TMDPROM (min)	Desviación estándar (%)	t_{exp}	Resultado
6,5	89,1	$S_{T1} = 1,1$	2,228	0,025	No hay diferencia	5,5	$ST1' = 0,59$	0,606	No hay diferencia
10,3	89,2	$S^R = 0,17$				6,0	$SR' = 0,50$		
Fuerza de compresión – 16,5 kN vs. 10,3 kN									
10,3	89,2	$S_R = 0,17$	2,228	1,563	No hay diferencia	6,0	$SR' = 0,50$	1,253	No hay diferencia
16,5	89,6	$S_{T2} = 0,72$				6,3	$ST2' = 0,43$		

Diseño del proceso de compresión - Establecimiento de los parámetros de proceso

Con el estudio realizado se definió el rango de la fuerza de compresión principal con el cual se pueden obtener comprimidos de furosemina por vía seca y a escala industrial. En la tabla 9 se presentan el rango de operación y los criterios de aceptación de las tabletas para controlar el proceso.

Tabla 9. Definición de la fuerza de compresión y de las características de calidad del producto en el proceso.

Parámetro del proceso	Rango de operación
Fuerza de compresión principal	7,5 kN - 16,5 kN
Velocidad de compresión	50 rpm
Característica de calidad del producto en proceso	Criterio de aceptación
Dureza inicial	7,0 kg-f - 16,5 kg-f
Desintegración	< 2 min
Friabilidad	< 0,5%
Variación de peso	< 0,5%

Los resultados obtenidos sirven como punto de partida para ajustar el proceso si se quiere realizar la compresión en otras tableteadoras rotativas [18]. Sin embargo, se debe tener en cuenta que todo cambio de equipo requiere que se haga la evaluación de su impacto sobre los atributos críticos de calidad del producto, como lo indican las guías SUPAC [29, 30].

CONCLUSIONES

Se evaluó el efecto de la fuerza de compresión sobre los atributos críticos de calidad de tabletas de furosemida obtenidas por compresión directa y se definieron las condiciones de operación en las cuales se puede llevar a cabo el proceso de compresión (7,5 kN a 16,5 kN) para obtener tabletas con una rápida (TMD < 7,5 min) y total liberación del fármaco (ED > 85%). Por medio de las pruebas de desempeño y utilizando como estadísticos de prueba los factores f_1 y f_2 y los parámetros ED y TMD, se demostró la equivalencia de las tabletas obtenidas en el rango de compresión establecido.

CONFLICTO DE INTERESES

Los autores no declaran conflicto de intereses.

REFERENCIAS

1. P. Suresh, "Effect of compression force on agglomeration of micronized active pharmaceutical ingredients: Techniques to prevent API agglomeration during compression", (Doctoral thesis), The University of Tennessee Health Science Center, 2012, pp. 17-48.
2. J.G. van der Watt, M.M. de Villiers, The effect of mixing variables on the dissolution properties of direct compression formulations of furosemide, *Drug Dev. Ind. Pharm.*, **21**, 18 (1995).
3. Y. Qiu, Y. Chen, G.G.Z. Zhang, L. Liu, W.R. Porter, "Developing solid oral dosage forms: Pharmaceutical theory and practice", Elsevier, London, 2009, p. 750.
4. M.C. Monedero, M.R. Jiménez, M.V. Velasco, A. Muñoz, Effect of compression speed and pressure on the physical characteristics of maltodextrin tablets, *Drug Dev. Ind. Pharm.*, **24**, 7 (1998).
5. FDA Guidance for Industry, Quality by Design for ANDAs. An example for immediate-release dosage forms, pharmaceutical development report example QbD for IR generic drugs, 2012.
6. The United States Pharmacopeial Convention, Inc., USP 38 - NF 33. "The United States pharmacopeia - National Formulary", Rockville MD, 2015.

7. G.E. Granero, M.R. Longhi, M.J. Mora, H.E. Jungiger, K.K. Midha, V.P. Shah, S. Stabchansky, J.B. Dressman, D.M. Barends, Biowaiver monographs for immediate release solid oral dosage forms: Furosemide, *J. Pharm. Sci.*, **99**, 2544 (2010).
8. FDA, “Guía para la industria: pruebas de disolución de formas de dosificación oral sólidas de liberación inmediata”, Departamento de Salud y Servicios Humanos de los Estados Unidos, Administración de Alimentos y Drogas, Centro de Evaluación e Investigación de Drogas (CDER), 1997.
9. T. Pinto, R. Takao, W. de Oliveria, Impact evaluation of changes in the manufacturing line of Cyproterone acetate through analysis of comparative dissolution profile, *Athens J. Nat. Formal Sci.*, **1**, 107 (2014).
10. Y.K. Han, L.D. Simionato, R.G. Calvo, M.B. Mattei, A.I. Segall, Comparison of dissolution profiles of furosemide tablets available in the Argentinian market, *J. Appl. Sol. Chem. Model.*, **3**, 186 (2014).
11. E.C. Carcamo, “Cinética de disolución de medicamentos”, Secretaría General de la Organización de los Estados Americanos, Monografía No. 24, 1981.
12. R. Heinz, H. Wolf, H. Schuchmann, L. End, K. Kolter, Formulation and development of tablets based on Ludipress and scale up from laboratory to production scale, *Drug Dev. Ind. Pharm.*, **26**, 513 (2000).
13. Ch. Ganesh, P. Kundan, S. Dhananjay, Ghodke, Pramod, Y. Govindrao, V.B. Ashok, R.H. Sharwaree, Effect of some physical parameters and crospovidone on directly compressed furosemide tablets, *Asian J. Pharmaceut.*, **2**, 235 (2008).
14. A.F. Marais, M. Song, M.M. de Villiers, Effect of compression force, humidity and disintegrant concentration on the disintegration and dissolution of directly compressed furosemide tablets using Croscarmellose sodium as disintegrant, *Trop. J. Pharm. Res.*, **1**, 125 (2003).
15. Ch. Ganesh, P. Kundan, Gh. Dhananjay, Sh. Khan, P. Yeole, Preparation and characterization of solid dispersion tablet of furosemide with crospovidone, *Res. J. Pharm. Tech.*, **4**, 386 (2008).
16. Ch. Ganesh, P. Kudan, P. Patel, H. Sharwaree, Formulaion and evaluation of solid dispersions of furosemide in sodium starch glycolate, *Trop. J. Pharm. Res.*, **1**, 43 (2009).
17. A.H. Gerhardt, Fundamentals of tablet compression - Pharmaceutical process, *J. GXP Compl.*, **14**, 70 (2010).

18. S. Forner, R. Salazar, Estudio comparativo del diseño de máquinas de comprimir rotativas, *Ind. Farm. Equip. Proc. Tecnol.*, **6**, 83 (1999).
19. M. Levin, Tablet press instrumentation. En “Encyclopedia of Pharmaceutical Technology”, Marcel Dekker, Inc., New York, 2002, pp. 1-26.
20. T. Souza, V. Franco, C. Panizzon, S. Balzan, A statistical approach to evaluating the manufacture of furosemide tablets, *Pharm. Technol.*, **35**, 112 (2011).
21. M.N. Bahr, A design of experiments for tablet compression, *Pharm. Technol.*, **35**, 104 (2011).
22. A. Mendyk, R. Jachowicz, K. Fijorek, Kinet DS: An open source software for dissolution test data analysis, *Dissolut. Technol.*, **1**, 7 (2012).
23. R.B. Kapil, Y.A. Biranwar, H.D. Salunke, P.L. Ughade, D.T. Baviskar, Compression parameters involved in powder compression and manufacturing of tablets, *Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res.*, **2**, 425 (2011).
24. A. Nokhodchi, An overview of the effect of moisture on compaction and compression, *Pharm. Technol.*, **1**, 46 (2005).
25. L.T. Chowhan, I. Palagyi. Hardness increase induced by partial moisture loss in compressed tablets and its effect on *in vitro* dissolution, *J. Pharm. Sci.*, **67**, 1385 (1978).
26. Y. Javadzadeh, A. Nokhodchi, The effect of storage conditions on the physical stability of tablets, *Pharm. Technol. Eur.*, **19**, 20 (2007).
27. K. Marshall, Compression/Compaction, FMC Corporation. Section 3, 1999, pp. 1-46.
28. G.F. Palmieri, E. Joiris. A. Bonacucina, M. Cespi, A. Mercuri, Differences between eccentric and rotary tablet machines in the evaluation of powder densification behavior, *Int. J. Pharm.*, **298**, 164 (2005).
29. FDA Guidance for Industry SUPAC-IR: Immediate release solid oral dosage forms scale-up and postapproval changes: Chemistry, manufacturing, controls, *in vitro* dissolution testing, and *in vivo* bioequivalence documentation, 2005.
30. FDA Guidance for Industry SUPAC-IR/MR: Immediate release and modified release solid oral dosage forms manufacturing equipment addendum, 2014.

CÓMO CITAR ESTE ARTÍCULO

J.C. Fonseca, P. Garzón-López, Efecto de la fuerza de compresión sobre los atributos críticos de calidad en tabletas de liberación inmediata de furosemida, *Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm.*, 46 (2), 235-255 (2017).

The assessment of pharmacoeconomic studies quality of Levodopa's use for the management of Parkinson's diseases, 2010-2015

Nelson H. Hermida Gutiérrez^{1*}, Lina M. Sanabria Becerra², Jorge A. Díaz Rojas^{2**}

¹ Universidad Manuela Beltrán, Bogotá, D. C., Colombia.

² Departamento de Farmacia, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, Sede Bogotá, Cra. 30 No. 45-03, Bogotá, D. C., Colombia.

* E-mail address: nelson.hermida@docentes.umb.edu.co

** E-mail address: jadiazr@unal.edu.co

Received: November 5, 2016

Accepted: August 16, 2017

SUMMARY

Levodopa (LD) has been the first choice in the management of Parkinson's disease (PD), since its introduction in the drug market; however, its prolonged use is related to the occurrence of motor complications, affecting the functionality and quality of life. Parkinson's disease is one of the most frequent among the neurodegenerative diseases in the world, and it is expected that the number of people who suffer it, will increase due to global population aging. The PD represents, nowadays and for the future, a high economic burden from all perspectives, including patients, payers, and society. So it is necessary to know about the use of LD in its treatment and to realize the quality of pharmacoeconomic studies in the past five years, to identify reliable sources of information related to the costs and benefits of this medication to contribute in making decisions. The aim of this paper is to assess the methodological quality of pharmacoeconomic studies related to the use of LD in PD, specifically those that are identified as cost-utility studies, applying the QHES instrument. A total of 19 articles were found, of which 5 met the inclusion criteria and were subjected to examination. The average overall score obtained after the evaluation was 77.2 out of 100, making evident a good quality of studies according to the method used.

Keywords: Levodopa, Parkinson's disease, cost-utility, methodological quality, QHES (Quality of Health Economic Studies).

RESUMEN

Evaluación de la calidad de estudios farmacoeconómicos del uso de Levodopa para el manejo de la enfermedad de Parkinson, 2010-2015

La Levodopa (LD) ha sido desde su introducción en el mercado la primera elección en el manejo de la enfermedad de Parkinson (EP); sin embargo, su uso prolongado está relacionado con la aparición de complicaciones motoras, afectándose la funcionalidad y calidad de vida. La EP es una de las enfermedades neurodegenerativas que se presenta con mayor frecuencia en el mundo y se espera que el número de personas que la padecen aumente, debido al envejecimiento poblacional a nivel mundial. La EP representa, actualmente y a futuro, una alta carga económica desde todas las perspectivas, incluyendo: pacientes, pagadores y la sociedad; por lo cual es necesario conocer el uso de la LD en el tratamiento de la misma y lograr determinar la calidad de los estudios farmacoeconómicos realizados en los últimos cinco años, para identificar fuentes fiables de información relacionadas con los costos y los beneficios de este medicamento que aporten en la toma de decisiones. El objetivo de este artículo es evaluar la calidad metodológica de los estudios farmacoeconómicos relacionados con el uso de la LD en la EP, específicamente aquellos que se cataloguen como estudios de costo-utilidad, aplicando el instrumento *QHES*. Se encontraron en total 19 artículos, de los cuales cinco cumplieron los criterios de inclusión y fueron sometidos al respectivo análisis. El puntaje global promedio obtenido posterior a la evaluación fue de 77,2 sobre 100, haciendo evidente una buena calidad de los estudios de acuerdo con el método utilizado.

Palabras clave: Levodopa, enfermedad de Parkinson, costo-utilidad, calidad metodológica, *QHES* (Quality of Health Economic Studies).

INTRODUCTION

Since the Parkinson's disease attributes were outlined in 1817 by English surgeon James Parkinson, there have been advanced to pinpoint what PD exactly is. Today, it is known that the Parkinson's disease is a neurodegenerative pathology, which attributes are tremors, hypokinesia, rigidity, and postural changes. Moreover, with the technology advancements, the PD's neurophysiological deficit is due to an affectation in the dopaminergic neurogenesis without a fully elucidated etiology [1, 2].

Since 1960's, Levodopa (LD) is part of the PD's treatment, and it is still a standard drug in the therapeutic arsenal for the disease's management [3-7]. Besides, it satisfies two of the most relevant aspect when assessing an anti-Parkinson's medication effectiveness, disability, and mortality. And despite LD's known side effects, its frequent use has not diminished considering the lack of achievement expected of the new medicines [8].

It is estimated that PD's prevalence will double for the year 2050; moreover, the adverse effects of anti-Parkinson's medications will increase in a similar proportion. For this reasons, strategies have been designed to enhance the availability in the cerebral level and to increase the medication's plasma half-life with the passage of the years; for instance, sustained action LD was created, and it was associated with inhibitors of catechol-O-methyltransferase (COMT), like Entacapone and Tolcapone. Another strategy is the alternative dosage forms that have been employed for PD advanced patients, for example, it is used the continuous intraduodenal infusion method to maintain drug stable concentrations, thus, reducing the fluctuations [9, 10].

Typically, PD studies have been focused on motor aspects; nevertheless, as new problems are addressed, other pathologic aspects became relevant, like depression, cognitive deterioration, and behavior disorders. Other factors stir interest, for instance, a patient can be developed dementia in the PD's natural course, and how it affects the caregivers, who developed negative emotions and significant stress as result of caring for a chronically-ill person [11, 12].

In Colombia, it is not possible to make a specific estimation of the PD's future in a local level because of the lack of recent epidemiologic data. The most recent is from the mid-nineties, EPINEURO, a neuro-epidemiologic baseline study, reported a prevalence of 4.7 (IC95%: 2.2 to 8.9) [13].

Accordingly, it is necessary to identify the use of LP in the PD's treatment and to determine the pharmacoeconomic studies' quality that has been done in the last five years. In the literature exists multiple systematic reviews of Parkinson's disease and others associated with the disease treatment [14-21]. But, there are not quality evaluations of the publication's methodology focused on cost-utility studies of the LD used in the EP treatment.

The importance of conducting this kind of assessments is based on the fact that health care decisions and their subsequent resource distribution are taken, in many cases, based on the available literature as reference. The objective of this paper is to assess the methodological quality of the pharmacoeconomic studies related to the Levodopa use in Parkinson's disease treatment. Particularly, those studies catalog as a cost-utility study. Being the last one, the author's preference for that kind of study relates the natural course of the disease with its effects on the life quality of both the patients and caregivers.

METHODOLOGY

Identification and selection

A bibliographic search was done in the following Databases: EMBASE, LILACS, and MEDLINE. The same MeSH terms were used in them: *Parkinson Disease* [Mesh] AND *Cost-Benefit Analysis* [Mesh] AND *Levodopa* [Mesh]. Four reviewers identified independently the eligible articles, which were selected by a consensus.

Inclusion and exclusion criteria

Internationally indexed articles were selected that comply with the following parameters: Adult population over eighteen years old, main diagnosis of Parkinson's disease, cost-utility analysis (CUA), Levodopa is included among one of the comparators, it must be in English or Spanish, and it was published in the period from January 1st, 2010 to December 1st, 2015.

Quality assessment

The *QHES* (*Quality of Health Economic Studies*) instrument was implemented to evaluate the selected articles [22]. 16 criteria were established in the instrument, which determined the three types of health care economic analysis: minimizing costs, cost-effectiveness, cost-utility; as shown in Table 1.

The four researchers read independently and then categorize each article according to the 16 items of the instrument. Subsequently, criteria were unified in the points where a disagreement in the rating was evidenced.

Data mining

In the review of each one of the articles, the extracted data was relevant for the analysis of the evidence as comparators, perspective, measuring instrument of life quality, QALY, time horizon, cost per QALY gained, country, among others.

Table 1. QHES (Quality of Health Economic Studies) Instrument [22].

	Question	Points	Yes	No
1	Was the article's objective presented in a clear, specific, and measurable form?	7		
2	Are the analysis' perspectives mentioned (social, third-party payer, etc.) and the reason for its selection?	4		
3	Were the estimates of the variables used in the analysis taken from the best available evidence (meaning, randomized clinical trial: the best, the experts' opinion, the worst)?	8		
4	If the estimates come from a subgroup analysis, were they predefined at the start of the study?	1		
5	Was the uncertainty handled by 1) statistical analysis to deal with random events or by 2) sensitivity analysis to cover some assumptions?	9		
6	Was the incremental analysis conducted between the alternatives for resources and costs?	6		
7	Was the methodology for data mining (including the value of health states and other benefits) mentioned?	5		
8	Does analysis horizon give time to the occurrence of all relevant and important results? Were costs and benefits beyond one year discounted (from 3% to 5%) and the discount rate justified?	7		
9	Was the measurement of costs appropriate and the methodology for estimating quantities and unit cost described clearly?	8		
10	Was the measurement(s) of primary results for the economic evaluation clearly mention and the main short-term and long-term outcome and negative outcomes included?	6		
11	Were the measures of health/scales outcomes valid and reliable? If previously approved measures of validity and reliability were unavailable, Was a justification given for the measure/scales used?	7		
12	Were the economic model (including the structure), the analysis and methods of the study, and the numerator and denominator components presented in a clear and transparent manner?	8		
13	Was the selection of the economic model, the main assumptions, and study's limitations declared and justified?	7		
14	Did the author(s) explicitly discuss the direction and the magnitude of potential biases?	6		
15	Were the study's conclusions/recommendations justified and based on the results of the study?	8		
16	Was there a statement that would reveal the study funding source?	3		

RESULTS AND DISCUSSION

Due to the implications in the life quality of those with Parkinson's disease (PD), only the cost-utility study was selected, which was subjected to the inclusion and exclusion criteria. In total 19 articles were found [23-41], of which 5 met the inclusion criteria and were submitted to the respective analysis (Figure 1). The list of excluded studies is provided in Annex (1).

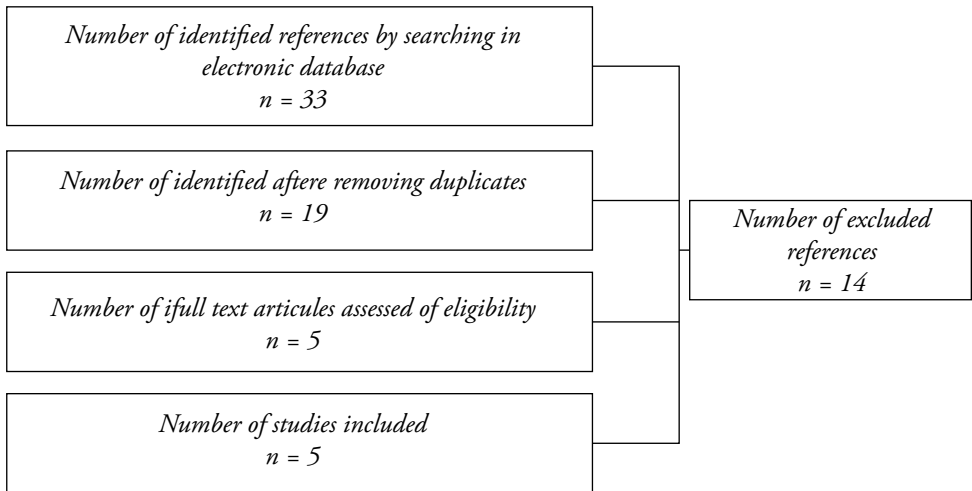


Figure 1. Flowchart for the evidence selection.

In all the cases, Levodopa was found as a comparator, regardless of whether it was concomitantly administered with another therapy. Two of the studies have a social perspective; three studies include a third-party payer perspective, and only one has a health professionals perspective; clarifying that one of the studies was carried out from two perspectives. It should be noted that four of the five studies included a Markov model, thus simulating in a more 'realistic' way what occurs in the disease process. The articles belonged to the following countries: two from the United Kingdom, one from the United States, one from Netherlands, and one from Norway (Table 2).

Table 2. Characteristics of the cost-utility studies.

Study	Objective	Perspective	Country	Study Considerations	Quality of Life Measurement
Eggington <i>et al.</i> [23]	To estimate the cost-utility of deep brain stimulation in combination with the best therapy compared with the best medical therapy alone in patients with advanced Parkinson's disease.	Payer The United Kingdom	The United Kingdom	Data from a *RCT (of 6 months) was used to develop a Markov model -Time horizon: 5 years	Parkinson's disease questionnaire ***PDQ-39
Lundqvist <i>et al.</i> [24]	To estimate costs and consequences for the health of the replacement of the conventional oral treatment for an intraduodenal infusion of Levodopa in the late stage of Parkinson's disease.	Society	Norway	-One year (open prospective study) -Probabilistic sensitivity analysis was based on resampling method with repetition (bootstrapping)	Questionnaire 15D
Van Boven <i>et al.</i> [25]	To estimate the profitability of ropinirole prolonged release in Parkinson's disease versus ropinirole immediate release, as the supplement to Levodopa.	Healthcare professionals	Netherlands	-Markov model -Life horizon -The base-case analysis. An intermediate time horizon of 5 years was chosen	Results of the prepared trials and the Dutch multidisciplinary consensus

(Continuous)

Table 2. Characteristics of the cost-utility studies (*continuation*).

Study	Objective	Perspective	Country	Study Considerations	Quality of Life Measurement
Groenenda <i>et al.</i> [26]	To evaluate the cost-utility of rasagiline or Entacapone as complementary therapies to Levodopa in comparison with Levodopa/Carbidopa/Entacapone versus the standard monotherapy with Levodopa in patients with ***PD and advance motor fluctuations in the United States.	Payer and society	The United States	-A stochastic Markov model of 2 years -The length of Markov cycles was four months	Published literature
Lowin <i>et al.</i> [27]	The evaluation of the cost-effectiveness relation of the intestinal gel of Levodopa/Carbidopa, comparing with the standard care for patients with advanced Parkinson's disease in the United Kingdom	National Health Service of the United Kingdom and social services of a personal nature	The United Kingdom	-Markov model -Time horizon was lifetime	EuroQol

*RCT: Randomized clinical trial. **PDQ (Parkinson's Disease Quality of Life Questionnaire). ***PD: Parkinson's disease.

Only two articles have a time horizon of fewer than two years; in both of them, the discount rate was not taken into account, in one of them because the time horizon was less than one year. As a relevant finding, all the studies stated the resources origins that financed the investigation, the great majority done by the pharmaceutical industry.

When evaluating the quality of pharmacoeconomic studies with the QHES (Quality of Health Economic Studies) instrument, it was found that all the studies reached an average score higher than 60, which reveals a good quality in the studies submitted to the qualification (Table 3). The overall detailed analysis of Table 3 allowed to make the following observations:

1. The criteria 1, 2, 5, 6, 7, 13, and 16 were fully satisfied by all the articles. Those referred to the following considerations: the goal and methodology of the study's data mining were explicit, the analysis perspectives were always mentioned, an incremental analysis and the study model, as well as, the source of funding was always declared; moreover, a sensibility analysis was conducted in all the cases. For these results, a good quality can be partially attributed to the evaluated studies.

2. The estimation of used variables was described except in one article. In two articles, the discount rate was not explicitly given, and in another, the cost measurements were not fully described, the primary outcome measures were only specified in one article, and in only two cases, the measures of outcome were valid and reliable. In two articles, it did not discuss the magnitude of the potential biases and the conclusions were not clear concerning the model results.

Cost-utility study

Eggington *et al.* [23], compared the deep cerebral stimulation combine with the best medical treatment as a management option for Parkinson's disease versus the best medical treatment independently (Levodopa and other antiparkinsonians) from a third -party perspective. Data of deep cerebral stimulation effects in the progressing PD symptoms from 6-months randomized clinical trial (RCD) were used to develop a Markov model, using a time horizon of 5 years. The total costs were: € 51,499 for deep brain stimulation combined with the best medical treatment, and € 36,023 for the best medical treatment independently (Levodopa and other antiparkinsonians), with QALYs of 2.21 and 1.21 respectively giving an incremental cost-effectiveness relation of € 15,440 per QALY gained.

Table 3. Quality evaluation of studies.

Criteria	Eggington <i>et al.</i> [23]	Lundqvist <i>et al.</i> [24]	Van Boven <i>et al.</i> [25]	Groenenda <i>et al.</i> [26]	Lowin <i>et al.</i> [27]
1	+	+	+	+	+
2	+	+	+	+	+
3	+	-	+	+	+
4	-	-	+	-	+
5	+	+	+	+	+
6	+	+	+	+	+
7	+	+	+	+	+
8	+	-	+	-	+
9	-	+	+	+	+
10	-	-	-	-	+
11	+	+	-	-	-
12	+	+	-	+	+
13	+	+	+	+	+
14	+	+	-	-	+
15	+	+	-	-	+
16	+	+	+	+	+
TOTAL	85	78	65	65	93

+ Criteria found in the study.

- Article did not fulfill or partially fulfilled the criteria.

In the United Kingdom under the perspective used, the results suggest that deep brain stimulation is a cost-effective intervention in patients with advanced Parkinson's disease who are eligible for surgery. However, this information should be taken with caution in the Colombian context, due to the marked differences between the population and the health system of both countries. It is clarified that the costs reported and extracted from the articles were adjusted to the constant prices of October 2015 and were homogenized to a single currency (Euros), considering each country's consumer price index (CPI) and the publication date of each article.

Lowin *et al.* [27] is another study conducted in the United Kingdom, in which the intestinal gel of Levodopa/Carbidopa was evaluated, compared with the defined standard

care as the best available oral medicine as medically determined in patients with advanced Parkinson's disease. A Markov model was used to quantify costs and results, with a lifetime horizon. An incremental cost per AVAC of € 29,048 was obtained for the intestinal gel of Levodopa/Carbidopa compared to standard care. The results were sensitive at the time of the treatment, health status at the start of treatment, and long-term benefit estimates. In this context, the intestinal Levodopa/Carbidopa gel is considered an effective treatment that improves the quality of life in advanced PD and should not be ignored despite the high cost involved, suggesting that this alternative could be considered cost-effective compared to standard care when other options of treatment are ineffective or inadequate. However, it is emphasized that more research is needed to fill gaps in information regarding the current data and to increase the robustness of the model.

In Norway, Lundqvist *et al.* [24] performed the study of a cohort of ten patients with advanced PD, who from an ineffective conventional (oral) treatment with LD switched to a new form of continuous intraduodenal administration of Levodopa (IDL). They had a follow-up of 12 months, used the unified scale of the PD to measure function and the questionnaire 15D for the quality of life. The objective of the study was to determine the costs and health consequences of the change from a conventional treatment to IDL; all from a social perspective. Although the data on effectiveness, safety, and quality of life results were proprietary, they mention the various limitations from a methodological point of view and conclude that the change in this type of therapy in patients with advanced disease is not cost-effective in their country due to an additional cost of € 88,166,638 per QALY gained.

In the study by Van Boven *et al.* [25], the profitability of ropinirole prolonged release in Parkinson's disease versus ropinirole immediate release, when used as a complement to Levodopa, was estimated. A Markov model was developed that included the following aspects related to the treatment: (I) the rate of progression of the disease, (II) rates of dyskinesia, and (III) adherence to medication. The base case analysis showed a favorable pharmacoeconomic profile for ropinirole prolonged release versus ropinirole immediate release. Overall, cost savings combined with moderate gains in life quality are considered and profitability remained acceptable within the investigated limits. In this study, it is concluded that ropinirole prolonged release presents a high probability of cost savings or at least being considered cost-effective in the Netherlands when compared to ropinirole immediate release when used as a complement to Levodopa. It should be clarified that the article mentions how the cost per QALY can be calculated and the necessary data to do it; however, it does not present the punctual value, which was calculated by the researchers of this evaluation, obtaining a value of € 113600.

A study conducted in the United States by Groenendaal *et al.* [26] aimed to evaluate the cost-utility of rasagiline or Entacapone as an adjuvant to Levodopa versus Levodopa/Carbidopa/Entacapone (LCE) and also in comparison to standard monotherapy with Levodopa in patients with advanced PE and motor fluctuations in that country. The study was carried out under two perspectives, from the perspective of society and from the perspective of the third payer, using a Markov model in which they performed six cycles of four months for a two-year time horizon with three health states and using the odds of varying from one health condition to another as reported in controlled clinical trials. The results show a higher cost-effectiveness in the use of rasagiline plus Levodopa, with cost-per-QALY data earned € -15,905 and Levodopa-Carbidopa-Entacapone-€ 17,051, when assessed from the perspective of the third-party payer. Moreover, better results are gained with the alternative of Entacapone plus Levodopa (cost per QALY gained € -14,560), assessed from the social perspective.

In all of the articles evaluated, the cost of QALYs gained was recalculated, which is presented underlined in Table 4, to compare it with the value reported by the authors. In all cases, there were minor differences; nonetheless, in the analysis performed by Van Boven *et al.* [25] as mentioned above, a punctual value was not presented.

Table 4. Results of the Cost-Utility Studies.

Study	Comparators	QALY	Total Costs (€)*	Cost per QALY Gained
The cost-effectiveness of deep brain stimulation in combination with best medical therapy, versus best medical therapy alone, in advanced Parkinson's disease [23]	- Deep brain stimulation (DBS) combined with the best medical treatment (BMT)	2.21 (DBS)	€ 51.499 (DBS)	€ 15.440 <u>€ 15.476</u>
	- Best medical treatment (BMT)	1.21 (BMT)	€ 36.023 (BMT)	
Real life cost and quality of life associated with continuous intraduodenal Levodopa infusion compared with oral treatment in Parkinson patients [24]	- Conventional Oral Treatment	0.63 (conventional oral treatment)	€ 4.016.949 (Oral treatment)	€ 88.166.638 <u>€ 90.420.638</u>
	- Continuous intraduodenal administration of Levodopa (IDL)	0.68 (IDL)	€ 8.537.981 (IDL)	

(Continuous)

Table 4. Results of the Cost-Utility Studies (*continuation*).

Study	Comparators	QALY	Total Costs (€)*	Cost per QALY Gained
Economic evaluation of ropinirole prolonged release for treatment of Parkinson's disease in the Netherlands [25]	-Ropinirole prolonged release	2.39 PR	€ 80.059 prolonged release	€ 113.600 They inform how to calculate it, and they give the data to do it, but the punctual value is not given
	-Ropinirole immediate release (IR) when used as a complement to Levodopa	2.31 IR	€89.147 immediate release	
Treatment of advanced parkinson's Disease in the united states A cost-utility model [26]	-Rasagiline as an adjunct therapy to Levodopa (RAS + LD)	1.054 (RAS+LD)	€ 59.168 (RAS+LD)	For comparator vs standard €-15.905 (RAS+LD) /// €- 16.398
	-Entacapone as adjunct therapy to Levodopa (ENT + LD)	1.048 (ENT+LD)	€ 62.573 (ENT+LD)	€- 14.560 (ENT+LD) /// € - 11.864
	-Levodopa/Carbidopa/ Entacapone (LCE)	1.048 (LCE)	€ 59.116 (LCE)	€- 17.051 (LCE) /// € - 17.683
	-Levodopa (LD), monotherapy, standard.	0.931 (LD monotherapy)	€ 61.185 (LD monotherapy)	
A cost-effectiveness analysis of Levodopa/ Carbidopa intestinal gel compared to standard Care in late stage Parkinson's disease in the UK [27]	-Levodopa/Carbidopa intestinal gel	1.88 (Levodopa/ Carbidopa intestinal gel)	€ 158.279 (Gel)	€ 29.048 € 28.353
	-Standard care	0.78 (Standard care)	€127.091 (Standard care)	

* Costs reported and extracted from the articles were adjusted to constant prices of October 2015 and were homogenized to a single currency (Euros); considering each country's consumer price index (CPI) and the publication date of each article.

Strength and limitations

The assignment of resources for health is limited in the case of the Colombian system. It is not based solely on economic considerations; it requires the opinion of experts and the review of economic analyses. Therefore, a quality analysis of information such as the one carried out in this research is relevant, especially for a disease, such as, Parkinson's disease whose prevalence is expected to increase over the years, and the decisions taken should take into account the improvement in the life quality of the patient along with the reduction of social burden.

Regarding the evaluation of the studies with the QHES (Quality of Health Economic Studies) instrument, a good quality was generally found because an average score of more than 60 was always obtained. This can be correlated with the detailed description in each article of aspects such as the objective, data mining methodology, analysis perspective, study model, the source of funding, and sensitivity analysis. Regarding applicability, it is important to note that the interventions, the comparator, and the country in which each study was performed, since, the costs reported were clearly described, and in all cases, the study population was appropriate for the subject evaluated [42, 43].

It is appropriate to mention the multiple methodological limitations of pharmacoeconomic assessments: results are obtained from assumptions that are supported by probabilities, sensitivity analyses do not necessarily have the capacity to reflect the reality of population behavior nor the different scenarios that arise in the course of the diseases, particularly those of neurological origin. Likewise, the external validity of these articles is low due to the reduced possibility that the results can be extrapolated to different regions from a social, cultural, and economic point of view. Authors such as Welte *et al.* [44] propose transfer criteria to evaluate, such as perspective, discount rate, cost approach, health system characteristic, variability in clinical practice, availability of technology, epidemiological variables of illness, life expectancy, preferences for socio-economic status, productivity, and lost work time, among others.

It is necessary to determine in each case: the correspondence between the country of study and the country of decision, the degree to which the criterion is relevant to the technology investigated and the likely effect of the transfer criterion on the results [43], evidencing this is the need to carry out studies that evaluate the life quality in PE and the costs from different perspectives in Latin America, so as to allow adequate decision making based on methodologically structured studies.

CONCLUSIONS

In this study, a review of the pharmacoeconomic evaluations for the use of Levodopa in Parkinson's disease was carried out, based on the QHES instrument [22], which qualifies methodological quality and has been used by other authors previously [45-49]. Only the articles that met inclusion criteria and were considered of cost-utility were taken, finding that the five articles analyzed obtained an overall average score of 77.2 out of 100. This reflects that these studies are of good quality, and this is probably attributable to the fact that they were recently carried out following the current guidelines.

Latin American articles were not found in the systematic search carried out. Therefore, it is necessary to conduct own studies that may be closer to our reality, taking into account the differences in the population, the resources destined for health, and the therapeutic alternatives employed.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors are grateful to Ms. María Jakelin Galvis and Mrs. Judith Otálora, students of the Master of Science in Pharmacology program of the Universidad Nacional de Colombia, for participating in the qualification of the quality of the articles, and also to Ms. Ingrid Carolina Diaz-Becerra for her cooperation in the Spanish-English-languages translation.

DISCLOSURE STATEMENT

No potential conflict of interest was reported by the authors.

REFERENCES

1. P. Tagle. Historia de la enfermedad de Parkinson. Pontifica Universidad Católica Chile. URL: <http://publicacionesmedicina.uc.cl/cuadernos/2005/HistoriaParkinson.pdf>, consultado en octubre 2015.
2. J. Michalland, Estudio del deterioro cognitivo temprano entre enfermos de mal de Parkinson sin demencia, *Rev. Chil. Neuro-Psiquiat.*, **46** (4), 263 (2008).
3. H. Nishijima, M. Tomiyama, What mechanisms are responsible for the reuptake of levodopa-derived dopamine in Parkinsonian striatum?, *Front. Neurosci.*, **10**, 575 (2016).

4. G. Hughes, D. Burn, Diagnosis and management of Parkinson's disease, *Prescriber*, **17** (21), 56 (2006).
5. S. Aquilonius, D. Nyholm, Development of new levodopa treatment strategies in Parkinson's disease-from bedside to bench to bedside, *Ups. J. Med. Sci.*, **122** (2), 71 (2017).
6. C. Zhuo, X. Zhu, R. Jiang, F. Ji, Z. Su, Y. Zhou, Comparison for efficacy and tolerability among ten drugs for treatment of Parkinson's disease: A network meta-analysis, *Sci. Rep.*, **8**, 45865 (2017).
7. J. Cheron, J. Deviere, A. Ballarin, F. Supiot, P. Eisendrath, The use of enteral access for continuous delivery of levodopa-carbidopa in patients with advanced Parkinson's disease, *United European Gastroenterol. J.*, **5** (1), 60 (2017).
8. M. Zappia, A. Nicoletti, D. Muñoz, J. Tapia, Reconsideraciones en el tratamiento de la enfermedad de Parkinson con levodopa: evidencias farmacodinámicas, *Rev. Neurol.*, **49** (1), 33 (2009).
9. D. Fernández, A. Pérez, L.J. López, Prevalencia de las complicaciones del tratamiento antiparkinsoniano: revisión sistemática y estimación de proyecciones, *Rev. Neurol.*, **61** (3), 97 (2015).
10. D. Nilsson, L.E. Hansson, K. Johansson, C. Nystrom, L. Paalzow, S.M. Aquilonius, Long-term intraduodenal infusion of a water based levodopa-carbidopa dispersion in very advanced Parkinson's disease, *Acta Neurol. Scand.*, **97** (3), 175 (1998).
11. O. Benavides, D. Albuquerque, P. Chaná, [Burden among caregivers of patients with Parkinson disease], *Rev. Med. Chil.*, **141** (3), 320 (2013).
12. D. Santos, J. Abella, Á. Aneiros, H. Santos, M.A. Llana, M. Macías, [Pain in Parkinson's disease: Prevalence, characteristics, associated factors, and relation with other non motor symptoms, quality of life, autonomy, and caregiver burden], *Rev. Neurol.*, **52** (7), 385 (2011).
13. A. Pradilla, A. Vesga, F.E. León, Estudio neuroepidemiológico nacional (EPI-NEURO) colombiano, *Rev. Panam. Salud Pública*, **14** (2), 104 (2003).
14. A. Radaideh, E. Rababah, The role of magnetic resonance imaging in the diagnosis of Parkinson's disease: A review, *Clin. Imaging*, **40** (5), 987 (2016).

15. T. Martins, A. Castro, J.J. Ferreira, Parkinsonism and related disorders pharmacological interventions for daytime sleepiness and sleep disorders in Parkinson's disease: Systematic review and meta-analysis, *Park. Relat. Disord.*, **27**, 1 (2016).
16. P. Tanwani, B.A. Fernie, A. Nikčević, M.M. Spada, A systematic review of treatments for impulse control disorders and related behaviours in Parkinson's disease, *Psychiatry Res.*, **225** (3), 402 (2015).
17. C.L. Chung, M.K.Y. Mak, Effect of repetitive transcranial magnetic stimulation on physical function and motor signs in Parkinson's disease: A systematic review and meta-analysis, *Brain Stimul.*, **9** (4), 475 (2016).
18. Z. Sheng, X. Jia, M. Kang, Statin use and risk of Parkinson's disease: A meta-analysis. *Behav. Brain Res.*, **309**, 29 (2016).
19. E. Bomasang, I. Fadlon, A.N. Murray, S. Himelhoch, Antidepressive treatments for Parkinson's disease: A systematic review and meta-analysis, *Parkinsonism Relat. Disord.*, **21** (8), 833 (2015).
20. R.W.K. Borgemeester, A.J. Lees, T. Van Laar, Parkinson's disease, visual hallucinations and apomorphine: A review of the available evidence, *Parkinsonism Relat. Disord.*, **27**, 35 (2016).
21. M.E. Pushpanathan, A.M. Loftus, M.G. Thomas, N. Gasson, R.S. Bucks, The relationship between sleep and cognition in Parkinson's disease: A meta-analysis, *Sleep Med. Rev.*, **26**, 21 (2015).
22. J.J. Ofman, S.D. Sullivan, P.J. Neumann, C.F. Chiou, J.M. Henning, S.W. Wade, J.W. Hay, Examining the value and quality of health economic analyses: Implications of utilizing the QHES, *J. Manag. Care Pharm.*, **9** (1), 53 (2003).
23. S. Eggington, F. Valldeoriola, K.R. Chaudhuri, K. Ashkan, E. Annoni, G. Deuschl, The cost-effectiveness of deep brain stimulation in combination with best medical therapy, versus best medical therapy alone, in advanced Parkinson's disease, *J. Neurol.*, **261** (1), 106 (2014).
24. C. Lundqvist, A.G. Beiske, O. Reiertsen, I.S. Kristiansen, Real life cost and quality of life associated with continuous intraduodenal levodopa infusion compared with oral treatment in Parkinson patients, *J. Neurol.*, **261** (12), 2438 (2014).
25. J.F.M. van Boven, A. Novak, M.T. Driessen, C. Boersma, M.M. Boomsma, M.J. Postma, Economic evaluation of ropinirole prolonged release for treatment of Parkinson's disease in the Netherlands, *Drugs Aging*, **31** (3), 193 (2014).

26. H. Groenendaal, M.L. Tarmnts, C. Armand, Treatment of advanced Parkinson's disease in the United States, *Methods*, **30** (11), 789 (2010).
27. J. Lowin, A. Bergman, K. Chaudhuri, L.J. Findley, C. Roeder, M. Schiffers, E. Wood, S. Morris, A cost-effectiveness analysis of levodopa/carbidopa intestinal gel compared to standard care in late stage Parkinson's disease in the UK, *J. Med. Econ.*, **14** (5), 584 (2011).
28. S. Eggington, A. Brandt, E. Reimer, M. Grifi, J. Nyberg, PMD46 - Cost-effectiveness of deep brain stimulation (DBs) in the management of advanced Parkinson's disease: A Swedish payer perspective, *Value in Health*, **18** (7), A352 (2015).
29. J. Lökk, U. Persson, Willingness to pay for a new drug delivery in Parkinson patients, *J. Multidiscip Healthc*, **7**, 431 (2014).
30. V. Ryazhenov, Economic evaluation of the treatment compliance in patients with Parkinson's disease received different preparations of levodopa, *Value in Health*, **16**, A623 (2013).
31. M. Kamusheva, G. Petrova, Intestinal gel Levodopa + Carbidopa in Parkinson's patients with frequent and prolonged akinesia - an economic evaluation, *Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res*, **22** (1), 244 (2013).
32. U.J. Kang, Diagnostic biomarkers of Parkinson's disease: What gain at what cost?, *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*, **83**, 769 (2012).
33. F. Valldeoriola, R. Puig, P. González, Cost analysis of the treatments for patients with complicated Parkinson's disease: Scope study, *Parkinsonism and Related Disorders*, **18**, 2 (S46) (2012).
34. M. Jann, Advanced strategies for treatment of Parkinson's disease: The role of early treatment, *Am. J. Manag. Care*, **17** (Suppl. 12), S315 (2011).
35. F. Valldeoriola, R. Puig, P. González, Cost analysis of deep brain stimulation, apomorphine infusion pumps and continuous duodenal levodopa-carbidopa infusion in patients with advanced Parkinson's disease in Spain: Scope study, *Eur. J. Neurol.*, **18** (Suppl. 2), 238 (2011).
36. A.L. Kurtz, D.I. Kaufer, Dementia in Parkinson's disease, *Curr. Treat. Opt. Neurol.*, **13** (3), 242 (2011).

37. J.J. Adam, H. van Houdt, B. Scholtissen, V. Visser-Vandewalle, A. Winogrodzka, A. Duits, Executive control in Parkinson's disease: Effects of dopaminergic medication and deep brain stimulation on anti-cue keypress performance, *Neurosci. Lett.*, **500** (2), 113 (2011).
38. M. Willis, U. Persson, Y. Zoellner, B. Gradl, Reducing uncertainty in value-based pricing using evidence development agreements, *Appl. Health Econom. Health Policy*, **8** (6), 377 (2010).
39. B.A. Racette, A.W. Willis, Time to change the blind men and the elephant approach to Parkinson disease?, *Neurology*, **85** (2), 190 (2015).
40. E. Walter, P. Odin, Cost-effectiveness of continuous subcutaneous apomorphine in the treatment of Parkinson's disease in the UK and Germany, *J. Med. Econom.*, **18** (2), 155 (2015).
41. K.L. Davis, H.M. Edin, J.K. Allen, Prevalence and cost of medication nonadherence in Parkinson's disease: Evidence from administrative claims data, *Mov. Disord.*, **25** (4), 474 (2010).
42. M. Díaz, E. Peña, A. Mejía, I. Flórez, Manual para la elaboración de evaluaciones de efectividad, seguridad y validez diagnóstica de tecnologías en salud, *Inst. Eval. Tecnol. Salud - IETS*, **64**, 1 (2014).
43. T. Mathes, M. Walgenbach, A. Antoine, D. Pieper, M. Eikermann, Methods for systematic reviews of health economic evaluations: a systematic review, comparison, and synthesis of method literature, *Med. Decis. Making*, **34** (7), 826 (2014).
44. R. Welte, T. Feenstra, H. Jager, R. Leidl, A decision chart for assessing and improving the transferability of economic evaluation results between countries, *Pharmacoeconomics*, **22** (13), 857 (2004).
45. S. Van der Schans, L.M.A. Goossens, M.R.S. Boland *et al.*, Systematic review and quality appraisal of cost-effectiveness analyses of pharmacologic maintenance treatment for chronic obstructive pulmonary disease: Methodological considerations and recommendations, *Pharmacoeconomics*, **35** (1), 43 (2017).
46. M. Plöthner, D. Ribbentrop, J-P. Hartman, M. Frank, Cost-effectiveness of pharmacogenomic and pharmacogenetic test-guided personalized therapies: A systematic review of the approved active substances for personalized medicine in Germany, *Adv. Therapy*, **33** (9), 1461 (2016).

47. B.U. Nwachukwu, W.W. Schairer, E. O'Dea, F. McCormick, J.M. Lane, The quality of cost-utility analyses in orthopedic trauma, *Orthopedics*, **38** (8), e673 (2015).
48. A. Lange, A. Prenzler, M. Frank, M. Kirstein, A. Vogel, J.M. Von der Schulenburg, A systematic review of cost-effectiveness of monoclonal antibodies for metastatic colorectal cancer, *Eur. J. Cancer*, **50** (1), 40 (2014).
49. A. Lange, A. Prenzler, M. Frank, H. Golpon, T. Welte, J.M. Von der Schulenburg, A systematic review of the cost-effectiveness of targeted therapies for metastatic non-small cell lung cancer (NSCLC), *BMC Pulm. Med.*, **14**, 192 (2014).

ANNEX 1. LIST OF STUDIES EXCLUDED FROM THE EVALUATION AND REASONS FOR EXCLUSION.

S. Eggington, A. Brandt, E. Reimer, M. Grifi, J. Nyberg, PMD46 - Cost-effectiveness of deep brain stimulation (Dbs) in the management of advanced Parkinson's disease: A Swedish payer perspective, *Value in Health*, **18** (7), A352 (2015). This study was excluded in the review, because it didn't include all the comparisons accounted in the inclusion criteria [28].

J. Lökk, U. Persson, Willingness to pay for a new drug delivery in Parkinson patients, *J. Multidiscip. Health*, **7**, 431 (2014). This study was excluded in the review, because it didn't include all the comparisons accounted in the inclusion criteria [29].

V. Ryazhenov, Economic evaluation of the treatment compliance in patients with parkinson's disease received different preparations of levodopa, *Value in Health*, **16**, A623 (2013). This study was excluded in the review, because it didn't include all the comparisons accounted in the inclusion criteria [30].

M. Kamusheva, G. Petrova, Intestinal gel Levodopa + Carbidopa in Parkinson's patients with frequent and prolonged akinesia - an economic evaluation, *Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res.*, **22** (1), 244 (2013). This study was excluded in the review, because it didn't include all the comparisons accounted in the inclusion criteria [31].

U.J. Kang, Diagnostic biomarkers of Parkinson's disease: What gain at what cost?, *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*, **83**, 769 (2012). This study was excluded in the review, because it didn't include the outcomes considered in the review [32].

F. Valldeoriola, R. Puig, P. González, Cost analysis of the treatments for patients with complicated Parkinson's disease: Scope study, *Parkinsonism and Related Disorders*, **18**, 2 (S46) (2012). This study was excluded in the review, because it didn't include the outcomes considered in the review [33].

M. Jann, Advanced strategies for treatment of Parkinson's disease: The role of early treatment, *Am. J. Manag. Care*, **17** (Suppl. 12), S315 (2011). This study was excluded in the review, because it didn't include all the comparisons accounted in the inclusion criteria [34].

F. Valldeoriola, R. Puig, P. González, Cost analysis of deep brain stimulation, apomorphine infusion pumps and continuous duodenal levodopa-carbidopa infusion in patients with advanced Parkinson's disease in Spain: Scope study, *Eur. J. Neurol.*, **18** (Suppl. 2), 238 (2011). This study was excluded in the review, because it didn't include all the comparisons accounted in the inclusion criteria [35].

A.L. Kurtz, D.I. Kaufer, Dementia in Parkinson's disease, *Current Treatment Options in Neurology*, **13** (3), 242 (2011). This study was excluded in the review, because it didn't include all the comparisons accounted in the inclusion criteria [36].

J.J. Adam, H. van Houdt, B. Scholtissen, V. Visser-Vandewalle, A. Winogrodzka, A. Duits, Executive control in Parkinson's disease: Effects of dopaminergic medication and deep brain stimulation on anti-cue keypress performance, *Neuroscience Letters*, **500** (2), 113 (2011). This study was excluded in the review, because it didn't include all the comparisons accounted in the inclusion criteria [37].

M. Willis, U. Persson, Y. Zoellner, B. Gradl, Reducing uncertainty in value-based pricing using evidence development agreements, *Appl. Health Econom. Health Policy*, **8** (6), 377 (2010). This study was excluded in the review, because it didn't include all the comparisons accounted in the inclusion criteria [38].

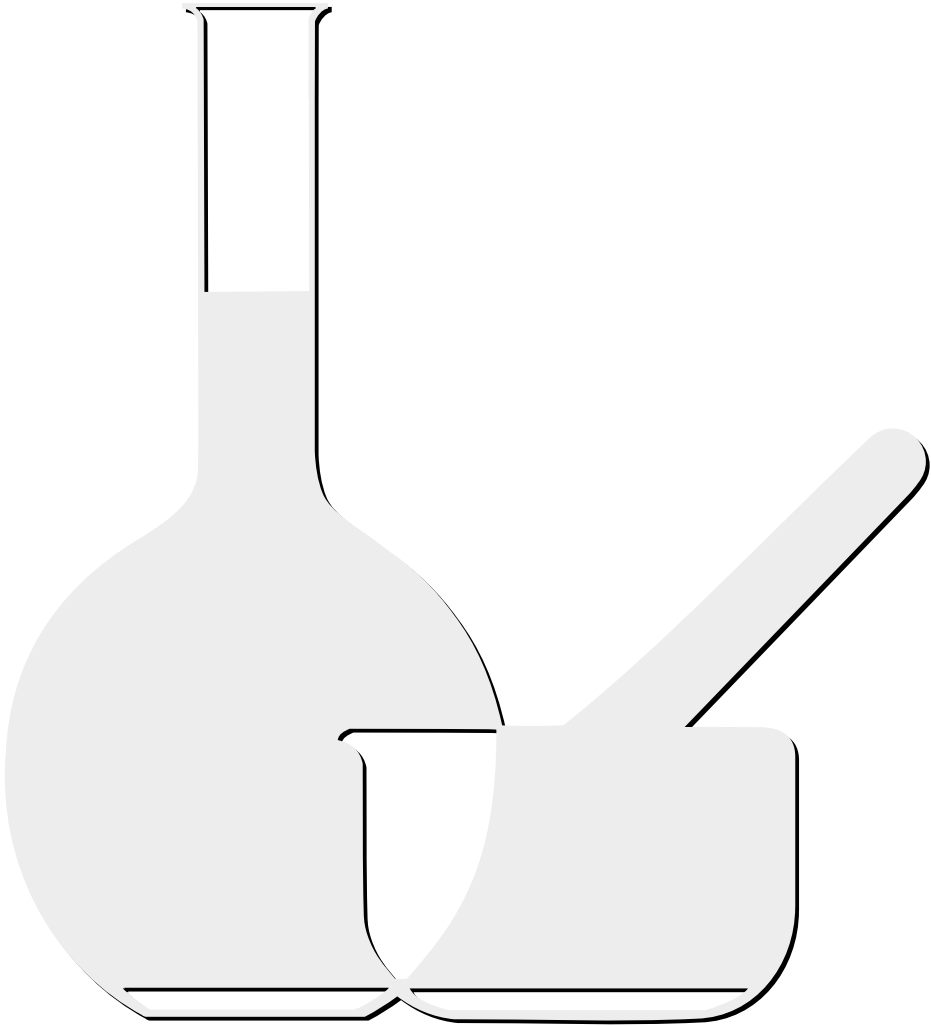
B.A. Racette, A.W. Willis, Time to change the blind men and the elephant approach to Parkinson disease?, *Neurology*, **85** (2), 190 (2015). This study was excluded in the review, because it didn't include all the comparisons accounted in the inclusion criteria [39].

E. Walter, P. Odin, Cost-effectiveness of continuous subcutaneous apomorphine in the treatment of Parkinson's disease in the UK and Germany, *J. Med. Economics*, **18** (2), 155 (2015). This study was excluded in the review, because it didn't include all the comparisons accounted in the inclusion criteria [40].

K.L. Davis, H.M. Edin, J.K. Allen, Prevalence and cost of medication nonadherence in Parkinson's disease: Evidence from administrative claims data, *Mov. Disord.*, **25** (4), 474 (2010). This study was excluded in the review, because it didn't include all the comparisons accounted in the inclusion criteria [41].

HOW TO CITE THIS ARTICLE

N.H. Hermida-Gutiérrez, L.M. Sanabria-Becerra, J.A. Díaz-Rojas, The assessment of pharmacoeconomic studies quality of Levodopa's use for the management of Parkinson's diseases, 2010-2015, *Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm.*, **42** (2), 256-277 (2017).



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, especificando el procesador de textos utilizado, al correo electrónico rccquifa_fcbog@unal.edu.co o a través del sistema OJS en el sitio web: <http://www.revistas.unal.edu.co/index.php/rccquifa>.

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 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.

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 ane-

arán 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, páginas inicial y final, y año entre paréntesis. Ej.:

1. H.P. Baden, L.A. Goldsmith, B. Fleming, A comparative study of the physicochemical properties of human keratinized tissues, *Bioch. Biophys. Acta*, **322**, 269-278 (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, 46(2)*
se terminó de editar, imprimir y encuadernar
en Proceditor, sobre papel bond de 90 gramos
Bogotá, D. C., Colombia.



