

Facultad de Ciencias
Sede Bogotá

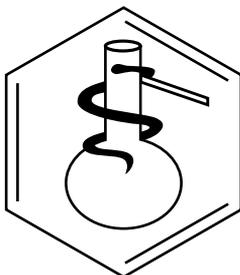


UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA



**REVISTA COLOMBIANA
DE CIENCIAS QUÍMICO-FARMACÉUTICAS**

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias
Departamento de Farmacia



REVISTA COLOMBIANA DE CIENCIAS QUÍMICO-FARMACÉUTICAS

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

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

Correo electrónico: rcquiifa_fcbog@unal.edu.co

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

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

<https://scholar.google.com/citations?user=TuBT68sAAAAJ&hl=es>

Rector Universidad Nacional de Colombia: Dolly Montoya Castaño, Ph. D

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

Decano Facultad de Ciencias: Jairo Alexis Rodríguez López, Ph. D.

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

Director Área Curricular de Farmacia: Maritza Adalina Rojas Cardozo, 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.

Juan R. Perilla, Ph. D., Department of Chemistry and Biochemistry, College of Arts and Sciences, University of Delaware, U.S.A.

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

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

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

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

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

Comité Editorial:

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

Álvaro F. Jiménez-Kairuz, Ph. D., Departamento de Farmacia, Facultad de Ciencias, 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.

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

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

Evalúadores:

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

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

Jorge E. Angel, Ph.D., Departamento de Química, Universidad del Zulia, Maracaibo, Venezuela.

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

Lucinda Villaescusa Castillo, Ph. D., Departamento de Ciencias Biomédicas, Facultad de Farmacia, Universidad de Alcalá, Alcalá de Henares, Madrid, España.

María Lujan Cuestas, Ph. D., Instituto de Investigaciones en Microbiología y Parasitología Médica, Oficina de Coordinación Administrativa Houssay, Consejo

Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Buenos Aires, República Argentina

Mariana C. Ferrero, Ph. D., Cátedra de Inmunología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires, República Argentina.

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

MISIÓN

La *Revista Colombiana de Ciencias Químico-Farmacéuticas* es un órgano de difusión en el cual se publican investigaciones científicas, comunicaciones técnicas y revisiones temáticas originales en las áreas de las ciencias farmacéuticas (véanse Normas para publicación). La revista está destinada principalmente a químicos farmacéuticos, químicos, ingenieros químicos, médicos cirujanos, médicos veterinarios, y a otros profesionales de las ciencias físicas y naturales, de la ingeniería y de las profesiones sanitarias relacionadas con el uso de medicamentos.

VISIÓN

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

ÉTICA

La responsabilidad de lo expresado en cada artículo es exclusiva de los autores y no representa ni compromete posiciones de la revista ni del cuerpo editorial. Los contenidos publicados pueden reproducirse siempre que se cite la fuente respectiva. Esta revista sigue los lineamientos del COPE (Committee on Publication Ethics), que pueden ser consultados en <http://publicationethics.org/>

LICENCIA CREATIVE COMMONS



Todo el contenido de esta revista, excepto donde 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/rcquiifa>

Contenido

- Avaliação do teor de vitamina C de preparados sólidos para refresco comercializados em Campo Grande-MS
Meyliane Fabiana Rosa, Aline Marques Rosa, Rúbia Adrieli Sversut, Marcos Serrou do Amaral, Nájla Mohamad Kassab 339
- Desarrollo de vectores génicos basados en polímeros sintéticos: PEI y PDMAEMA
Ivonne Lorena Díaz-Ariza, César Augusto Sierra, León Darío Pérez-Pérez 350
- Potenciales candidatos antimaláricos y antiplasmodiales de origen natural y sintético
Ana María Mesa-Vanegas 375
- Avaliação teórica do uso do oxihidróxido de vanádio trivalente na detecção eletroquímica de nandrolona
Volodymyr V. Tkach, Yana G. Ivanushko, Svitlana M. Lukanova, Sílvio C. de Oliveira, Fauze J. Anaissi, Nataliia M. Storoshchuk, Petro I. Yagodynets ' 400
- Extracción y encapsulación de compuestos fenólicos provenientes de cascarilla de arroz
Deisy Sánchez-Molina, Mayra Vargas-Porras, Rodrigo Ortega-Toro, Yineth Piñeros-Castro 410
- Validación de una metodología analítica por HPLC-DAD para la cuantificación de ácido benzoico complejado, en un ensayo de permeación transdérmica *in vitro* empleando piel de cerdo
Laura A. Martínez, Jorge A. Martínez, Yolima Baena 424
- A descrição matemática do desempenho do novo derivado acridínico na detecção eletroanalítica do conteúdo total do ácido gálico em alfarroba
Volodymyr V. Tkach, Marta V. Kushnir, Yana G. Ivanushko, Sílvio C. de Oliveira, Mykhailo P. Zavorodnii, Oleksandr A. Brazhko, Olga V. Luganska, Oleksandra V. Ahafonova, Petró I. Yagodynets ' 441

Avaliação do teor de vitamina C de preparados sólidos para refresco comercializados em Campo Grande-MS

Meyliane Fabiana Rosa¹, Aline Marques Rosa¹, Rúbia Adrieli Sversut¹, Marcos Serrou do Amaral², Nájla Mohamad Kassab^{1*}

¹ Laboratório de Tecnologia Farmacêutica, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Alimentos e Nutrição, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Avenida Costa e Silva s/nº, Bairro Universitário, CEP nº 79070-900, Campo Grande-MS.

* Correio eletrônico: nmkassab@gmail.com.

² Instituto de Física, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Avenida Costa e Silva s/nº, Bairro Universitário, CEP nº 79070-900, Campo Grande-MS.

Recebido em: 29 de setembro de 2017

Aceito em: 31 de maio de 2018

RESUMO

Os sucos naturais têm sido amplamente substituídos pelos preparados sólidos para refresco (PSR), o que pode resultar em perda nutricional de componentes importantes, como o ácido ascórbico (AA). Dessa forma, este estudo objetivou analisar o teor de AA, determinar a acidez total titulável e o pH em amostras de PSR sabor abacaxi comercializados nos mercados varejistas de Campo Grande-MS e, além disso, caracterizar o AA empregado como substância química de referência. Foram analisadas 10 amostras de PSR sabor abacaxi, por meio do método de Tillmans modificado, e todas apresentaram teor de AA acima do mínimo exigido na dose dietética recomendada, atendendo aos requisitos da RDC nº 360/2003. Entretanto, 50% das amostras apresentaram teor de AA acima do limite máximo permitido de 20% para mais ou para menos segundo o declarado no rótulo. O estudo realizado confirmou que a utilização dos PSR é uma boa opção alimentícia para alcançar a dose diária necessária de AA a baixo custo.

Palavras-chave: vitamina C, titulometria, determinação do teor, controle de qualidade.

SUMMARY

Evaluation of the vitamin C content of solid preparations for soft drinks marketed in Campo Grande-MS

Natural juices have been largely replaced by solid refreshments (SR), which can result in nutrient loss of important components, such as ascorbic acid (AA). Thus, this study aimed to analyze the AA content, determine the titratable total acidity and pH in samples of pineapple-flavored SR marketed in the retail markets of Campo Grande-MS and, in addition, characterize AA used as Reference Chemical Substance. Ten samples of pineapple-flavored SR were analyzed using the modified Tillmans method, and all presented AA content above the minimum required in the recommended dietary dose, meeting the requirements of RDC 360/2003. However, 50% of the samples presented AA content above the maximum allowed limit of 20% for more or less as stated on the label. The study confirmed that the use of SR is a good dietary option to achieve the necessary daily dose of AA at a low cost.

Key words: Vitamin C, titrimetry, content determination, quality control.

INTRODUÇÃO

Os preparados sólidos para refrescos (PSR) são definidos como produto à base de suco ou extrato vegetal de sua origem e açúcares, podendo ser adicionados de edulcorantes hipocalóricos e não calóricos, destinados à elaboração de bebida, para o consumo imediato, pela adição de água potável [1]. Os PSR que não contiverem a matéria-prima natural de sua origem são considerados artificiais cuja denominação vem seguida da palavra “artificial” e, ainda, é vedado o uso da denominação “bebida de fruta, ou de extrato vegetal ou de parte do vegetal” em substituição à denominação “refresco” [1].

Os PSR surgiram na década de 60 e eram comercializados em embalagens pequenas. No início dos anos 90 houve uma perda de mercado dos PSR para os refrigerantes. A partir de então, foi necessário inovar, e no final dos anos 90, a indústria alimentícia optou pela adição de polpa de fruta na composição do PSR, além de estampar as embalagens, mudando assim o conceito do consumidor [2].

Essas mudanças alavancaram a produção dos PSR, chegando a quase 4,5 bilhões de litros em 2016, aumento de 3,11 % quando comparado ao ano de 2010. Atualmente, os

PSR são utilizados em mais de 54% dos lares brasileiros, com consumo anual *per capita* de 21,79 litros [3].

De acordo com uma pesquisa de hábitos alimentares realizada no Brasil os PSR são considerados itens essenciais da cesta básica e constituem alternativa econômica em comparação a sucos prontos e refrigerantes [4], pois além do baixo custo, os PSR ainda têm como vantagens a praticidade no preparo e a adição de vitaminas e minerais na composição [5]. Apesar desses ingredientes serem opcionais, quando adicionados, devem estar em quantidade igual ou superior a 5% da ingestão diária recomendada por porção indicada no rótulo [6].

A principal vitamina intencionalmente adicionada aos PSR é o ácido L-ascórbico (AA), também conhecido como vitamina C (ver figura 1). O AA tem fórmula molecular $C_6H_8O_6$ e massa molecular de $176,12 \text{ g mol}^{-1}$. O AA apresenta-se como pó fino, cristalino, branco ou ligeiramente amarelado. No estado sólido é estável ao ar, mas em solução oxida-se rapidamente. Sua solução aquosa é límpida. É facilmente solúvel em água, pouco solúvel em etanol e acetona, insolúvel em éter etílico, clorofórmio, éter de petróleo e benzeno. Funde-se na faixa de 189 a 192°C, com decomposição [7].

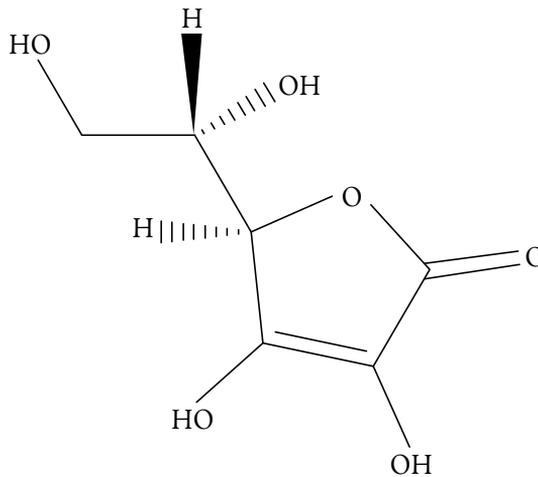


Figura 1. Estrutura química do ácido L-ascórbico.

O AA não é sintetizado pelo organismo humano, todavia é essencial para diversas funções bioquímicas, atuando como agente redutor em inúmeras reações, como síntese e reparo do tecido conjuntivo, além de facilitar a absorção de ferro no intestino. Sua ação

antioxidante protege contra infecções e danos causados por radicais livres, como em situações de estresse oxidativo, protegendo o endotélio capilar [8, 9].

Por esses benefícios, o uso do AA foi amplamente difundido e muitos métodos analíticos foram desenvolvidos para quantificá-lo em diversas matrizes. Em sucos de frutas o método de Tillmans é o mais utilizado por ser sensível e capaz de quantificar baixos teores de AA. O 2,6-diclorofenol-indofenol (DCFI) é o indicador desse método, sofrendo redução na presença de AA [10], conforme ilustrado na figura 2.

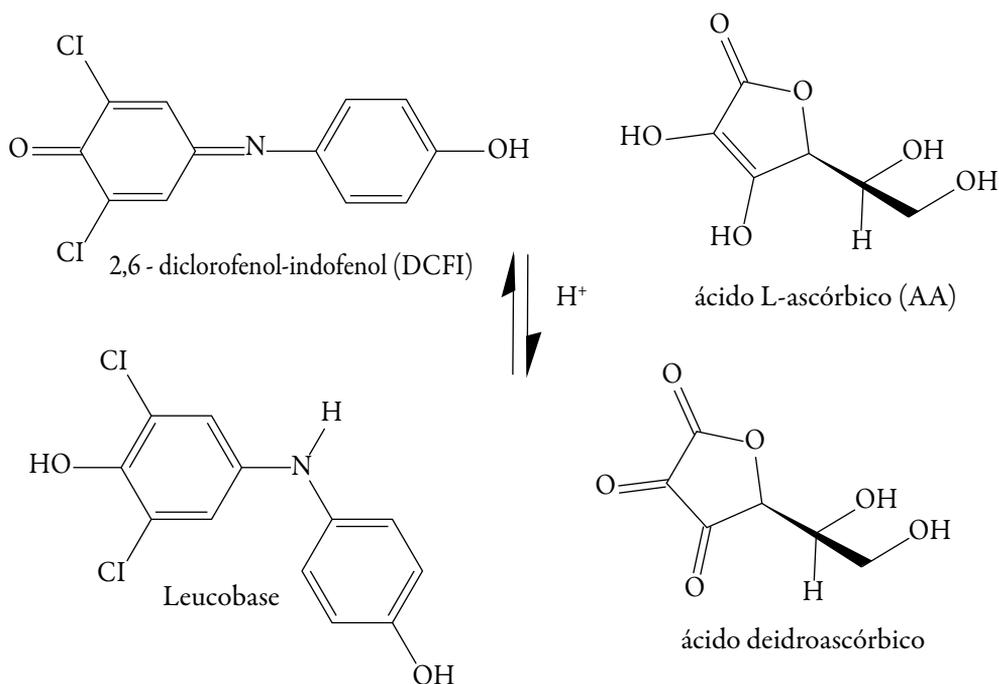


Figura 2. Reação de redução do 2,6-diclorofenol-indofenol (DCFI) pelo ácido L-ascórbico (AA).

A reação é realizada na presença de solução aquosa de ácido oxálico 1% (p/v) para evitar a auto-oxidação do AA em pH elevado. O ponto final da titulação é detectado pelo aparecimento da coloração rosada no titulado, que caracteriza o excesso DCFI não reduzido em solução ácida [11].

O aumento do consumo de sucos industrializados pela população brasileira na última década fez com que a ANVISA por meio da RDC n° 360/2003 instituisse normas de qualidade para a comercialização de PSR. Entretanto, são poucos os trabalhos publicados na literatura referentes à determinação do teor de AA em refrescos em pó [4, 5, 12, 13].

Considerando a escassez de trabalhos científicos relacionados com a qualidade dos PSR, tornou-se justificável a realização do presente trabalho, o qual teve por objetivo realizar a determinação do teor de AA, acidez total titulável (ATT) e o pH em amostras de PSR sabor abacaxi comercializados em mercados varejistas de Campo Grande-MS com intuito de verificar se os mesmos atendem a legislação vigente e, ademais, caracterizar o AA empregado como Substância Química de Referência (SQR).

METODOLOGIA

Substância química de referência (SQR) e amostras

A SQR do ácido L-ascórbico com 97,54% de pureza declarada foi adquirida da distribuidora farmacêutica Valdequímica. Foram adquiridas dez amostras de diferentes marcas de PSR no sabor abacaxi, em mercados varejistas da cidade de Campo Grande-MS. As amostras foram codificadas por letras de A a J.

Caracterização da SQR

A SQR de AA foi previamente identificada através da determinação, em triplicata, da faixa de fusão, empregando o equipamento digital PF1500 Gehaka[®] e tubos capilares de 1 mm de espessura e 6 cm de comprimento.

Adicionalmente, realizou-se a identificação por espectroscopia de absorção na região do UV, empregando o modo varredura de 200 a 400 nm no espectrofômetro UV-VIS da Thermo Scientific[®] modelo Evolution 60S.

Além disso, também foram avaliados a solubilidade frente aos solventes água, etanol, acetona, éter etílico e clorofórmio e o pH da SQR de AA, por meio do medidor de pH digital Bel Engineering[®] modelo W3B.

Preparação das amostras e determinação do teor de AA

Pesou-se de cada amostra a quantidade de pó equivalente a 25 mg de AA, a qual foi transferida para balão volumétrico de 250 mL, completou-se o volume com solução aquosa de ácido oxálico 1% (p/v). Em seguida, uma alíquota de 25 mL foi transferida para um balão volumétrico de 50 mL e o volume foi completado com ácido oxálico 1% (p/v). Por fim, transferiu-se 10 mL da solução anterior para Erlenmeyer contendo 30 mL de ácido oxálico 1% (p/v), o qual foi titulado com DCFI. Esse é o método titulométrico de Tillmans recomendado pela Association of Official Analytical Chemists e modificado por Benassi e Antunes [14].

As determinações titulométricas foram realizadas em triplicata e os reagentes e solventes empregados eram de grau analítico.

Acidez total titulável (ATT)

Foi diluído 1,0 g de PSR em 50 mL de água destilada e, em seguida, titulou-se com solução de NaOH 0,1 N, empregando 2 gotas de fenolftaleína como indicador. A ATT foi determinada em triplicata e expressa em gramas de ácido cítrico anidro/100 g de suco pronto [10].

Determinação do pH

A determinação do pH foi realizada na temperatura de 24 ± 2 °C após a preparação do suco conforme recomendação do fabricante expressa no rótulo. Nessa análise foi utilizado o medidor de pH da marca Bel Engeneering modelo W3B, previamente calibrado.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Caracterização da SQR

A SQR apresentou-se como pó cristalino ligeiramente amarelado, facilmente solúvel em água, pouco solúvel em etanol e acetona e insolúvel em éter etílico e clorofórmio. A fusão ocorreu na temperatura de 191,2°C e o pH encontrado foi 2,3. Esses resultados corroboram com a monografia do fármaco [7].

A figura 3 ilustra o perfil espectral da SQR do AA, realizado por espectroscopia de absorção na região do UV, empregando HCl 0,1 M como solvente. O resultado encontrado está condizente com o descrito na literatura, sendo o máximo de absorção próximo a 250 nm [15]. Dessa forma, a SQR cumpriu os testes de identificação propostos pela Farmacopeia Brasileira [7].

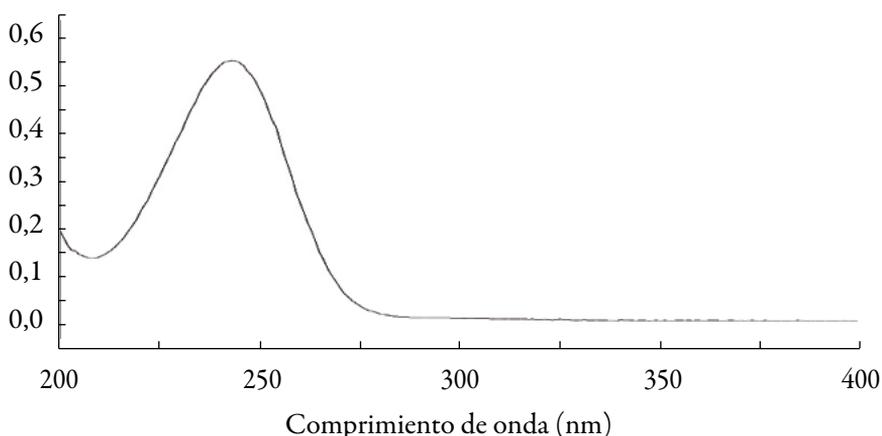


Figura 3. Perfil espectral do ácido L-ascórbico com o máximo de absorção em 243nm na região do UV empregando HCl 0,1 M como solvente.

Análise quantitativa das amostras

Os resultados encontrados nas determinações de teor de AA, acidez total titulável e pH das amostras de PSR analisadas estão ilustrados na tabela 1.

Tabela 1. Teor médio de AA, porcentagem da ingestão dietética de referência (IDR), valor médio de acidez total titulável (ATT) e pH dos PSR sabor abacaxi analisados.

Amostra	Teor de AA (mg/100 mL)		IDR ^b (%/100 mL)		ATT (g C ₆ H ₈ O ₇ /100 g)	pH
	Declarado	Encontrado ^a	Declarado	Encontrado ^a		
A*	6,75	9,96±0,32	15,0	22,14±0,32	0,34±0,10	3,37
B	3,35	3,66±0,33	7,44	8,14±0,33	0,21±0,05	3,48
C*	3,40	4,57±0,01	7,55	10,17±0,01	0,24±0,05	3,50
D	8,50	8,28±0,01	18,88	18,40±0,01	0,21±0,01	3,53
E	7,50	6,49±0,33	16,66	14,42±0,33	0,20±0,05	4,10
F	3,40	3,96±0,33	7,55	8,82±0,33	0,24±0,15	3,08
G*	4,50	5,93±0,32	10,0	13,19±0,32	0,17±0,05	3,54
H*	3,40	4,58±0,01	7,55	10,20±0,01	0,22±0,05	3,37
I	3,40	3,55±0,65	7,55	7,89±0,65	0,20±0,05	3,47
J*	7,50	10,29±0,01	16,66	22,88±0,01	0,16±0,05	3,25

^aMédia de três determinações com desvio padrão.

^bIngestão dietética de referência (IDR) de AA = 45 mg para adultos.

*Amostras com teor de AA acima do recomendado pela RDC 360/2003

C₆H₈O₇: ácido cítrico.

A RDC 360/2003 estabelece que uma vez declarada a presença de AA no rótulo, o teor deve ser igual ou superior a 5% da IDR, por porção e, todas as amostras analisadas continham teor de AA acima do estabelecido, o que demonstra que as empresas produtoras dos PSR têm cumprido com as recomendações da legislação [6].

Contudo, os limites de AA nos PSR, segundo a RDC 360/2003, devem estar entre 80 a 120% do valor declarado [6]. Dentre as amostras analisadas, 50% apresentaram teor acima do recomendado, como pôde ser observado na tabela 1, entretanto, nenhuma amostra apresentou teor de AA abaixo do limite mínimo permitido. Os teores elevados de AA podem ser justificados pelo uso dessa substância como aditivo alimentar para prevenir a deterioração dos alimentos por mecanismos oxidativos [16].

Os poucos trabalhos disponíveis na literatura referentes à determinação do teor de AA em refrescos em pó também encontraram discrepâncias entre os valores declarados e os obtidos experimentalmente. Moreira *et al.* [17] avaliaram 11 amostras de PSR, das quais 4 continham teores de AA superiores aos declarados nos rótulos. Cruz *et al.* [13] analisaram o teor de AA de 10 amostras de PSR sabor limão e laranja e todas apresentaram quantidades de AA maiores do que o informado nas embalagens.

José *et al.* [12] ao realizar a determinação do teor de AA em PSR sabor limão constataram que todas as amostras continham teor inferior ao mínimo estabelecido pela legislação. Granato *et al.* [18] avaliaram 60 amostras de bebidas prontas para beber e sucos em pó e em 76,7% das amostras não foram encontrados valores similares aos declarados nas embalagens. Além disso, os teores de AA encontrados no estudo foram de 12% a 90% menores do que os valores declarados pelos fabricantes.

Moreira *et al.* [5] analisaram 11 amostras de PSR sabor tangerina e verificaram que a variação dos teores de AA obtidos experimentalmente em relação aos valores declarados nas embalagens foi superior a 20%. Assim, as marcas analisadas não estavam em conformidade com a legislação.

Amostras de PSR com teores de AA acima de 7,5% da IDR, em 100 mL da bebida pronta para consumo, são classificadas como ricas em vitamina C, enquanto amostras com teores de AA acima de 15,0% são classificadas como fontes de AA [19]. Portanto, as amostras A, D e J analisadas constituem fontes de AA, enquanto que as demais amostras são classificadas como ricas em AA.

Dessa forma, houve não conformidade nos rótulos de cinco amostras, os quais informavam que os produtos eram fontes de vitamina C, entretanto os teores de AA encontrados nessas amostras foram abaixo de 15%, classificando-as como ricas em vitamina C.

A metodologia empregada nesse estudo para a determinação do teor de AA foi escolhida por ser o método oficial recomendado por compêndios internacional (AOAC) e nacional (Instituto Adolfo Lutz) e, além disso, por ter sido amplamente utilizada em trabalhos que realizaram a quantificação de vitamina C em amostras de PSR [10, 11, 13, 14, 17, 18].

Em relação à ATT e ao pH (ver tabela 1), verificou-se uma pequena variação entre as amostras. O teor de ácido cítrico foi mais elevado na amostra A, porém, assim como no trabalho de Souza [2], não foi observado correlação direta entre os valores de pH e ATT, provavelmente devido a presença de outros componentes contidos nos PSR que podem ter exercido efeito tamponante, justificando a pouca variação de pH em

amostras com quantidade superior de ácido cítrico. A legislação que estabelece normas com relação ao AA mostra-se falha, pois não estabelece parâmetros para ATT e pH [6].

Os resultados obtidos demonstraram que os PSR podem substituir os sucos de fruta, levando em conta que todas as amostras apresentaram um elevado teor de AA, são de baixo custo, de fácil de preparo e armazenamento. Todavia, algumas amostras não estavam em conformidade com a legislação, apresentando teor de AA acima de 20% em relação ao declarado no rótulo.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Laboratório de Tecnologia Farmacêutica da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul pela disponibilização dos equipamentos utilizados nesse trabalho.

CONFLITO DE INTERESSES

Os autores declaram que não há conflito de interesses.

REFERÊNCIAS

1. Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Portaria nº 544, de 16 de Novembro de 1998. Aprova os regulamentos Técnicos para Fixação dos Padrões de Identidade e Qualidade, para refresco, refrigerante, preparado ou concentrado líquido para refresco ou refrigerante, preparado sólido para refresco, xarope e chá pronto para o consumo. Diário Oficial da União (17 de setembro de 1998).
2. A.P. Souza, "Comportamento higroscópico, avaliação física, físico-química e mineral do preparado sólido para refresco nos sabores manga, laranja, maracujá e abacaxi" [dissertação], Fortaleza, Universidade Federal do Ceará (2007).
3. Associação Brasileira das Indústrias de Refrigerantes e de Bebidas não Alcoólicas (ABIR), Refrescos em pó, URL: <http://abir.org.br/o-setor/dados/refrescos-em-po/>. Acessado em setembro 2017.
4. P.T. Silva, E. Fialho, M.L.M. Lopes, V.L.V. Mesquita, Sucos de laranja industrializados e preparados sólidos para refresco: estabilidade química e físico-química, *Ciênc. Tecnol. Aliment. Campinas*, **25**, 597 (2005).

5. C.F.F. Moreira, P.M. Pedrote, L.S. Gomes, T.H.P. Silva, M.L.M. Lopes, V.L. Valente-Mesquita. Preparados sólidos para refresco sabor tangerina: análise do teor de ácido ascórbico e da adequação da rotulagem nutricional, *Congresso Nacional da SBAN dos Genes à Coletividade*, **10**, 146 (2009).
6. Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Resolução RDC nº 360, de 23 de Dezembro de 2003. Aprova Regulamento Técnico sobre Rotulagem Nutricional de Alimentos Embalados, tornando obrigatória a rotulagem nutricional. Diário Oficial da União (26 de dezembro de 2003).
7. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, “Farmacopeia Brasileira”, 5 ed., Brasília, 2010, Vol. 2, p. 570.
8. P.C. Champe, R.A. Harvey, D.R. Ferrier, “Bioquímica Ilustrada”, Artmed, Porto Alegre, 2006, p. 544.
9. E.S. Lima, E.G. Silva, J.M.M. Neto, G.C. Moita, Redução de vitamina C em suco de caju (*Anacardium occidentale L.*) industrializado e cajuína, *Quim. Nova*, **30**, 1143 (2007).
10. Instituto Adolfo Lutz. “Métodos físico-químicos para análise de alimentos”. 1ed. digital, São Paulo, 2008. p. 668. URL: http://www.ial.sp.gov.br/resources/editorinplace/ial/2016_3_19/analisedealimentosial_2008.pdf, acessado em setembro de 2017.
11. Association of Official Analytical Chemistrys. “Official methods of analysis” AOAC International, Vol. 2, 1997.
12. B.A. José, J.M. Souza, F.C. Lavinás, Avaliação do teor de ácido ascórbico e dos parâmetros físico-químicos de amostras de preparados sólidos para refresco, sabor limão, *Revista Acadêmica Saúde & Ambiente*, **4** (2009). URL: <http://publicacoes.unigranrio.edu.br/index.php/sare/article/view/587>.
13. R.A.N. Cruz, L.P. Lobato, J. S. Santos, Ácido ascórbico em preparados sólidos para refresco sabores limão e laranja, *Scientia Plena*, **9**, 1 (2013).
14. M.T. Benassi, A.J. Antunes, A comparison of metaphosphoric and oxalic acids as extractants solutions for the determination of vitamin C in selected vegetables, *Braz. Arch. Biol. Technol.*, **31**, 507 (1988).
15. A.C. Moffat, M.D. Osselton, B. Widdop, “Clarke’s Analysis of Drugs and Poisons: in pharmaceuticals, body fluids and postmortem material”, 4 ed., Pharmaceutical Press, London, 2011.

16. Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Resolução RDC n° 45, de 3 de novembro de 2010. Regulamento técnico sobre aditivos alimentares autorizados segundo as Boas Práticas de Fabricação. Diário Oficial da União (2010).
17. C.F.F. Moreira, M.L.M. Lopes, V.L. Valente-Mesquita, Impacto da estocagem sobre atividade antioxidante e teor de ácido ascórbico em sucos e refrescos de tangerina, *Rev. Nutr., Campinas*, **25**, 743 (2012).
18. D. Granato, F.V.B.W. Piekarski, M.L. Masson, Assessing the ascorbic acid contents in beverages and powdered juices: comparison between the experimental data and the values displayed on the product label, *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, **71**, 331 (2012).
19. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria da Vigilância Sanitária, Portaria n° 31, Regulamento técnico para fixação de identidade e qualidade de alimentos adicionados de nutrientes essenciais. Diário Oficial da União (13 de janeiro de 1998).

COMO CITAR ESTE ARTIGO

M.F. Rosa, A.M. Rosa, R.A. Sversut, M.S. Amaral, N.M. Kassab, Avaliação do teor de vitamina C de preparados sólidos para refresco comercializados em Campo Grande-MS, *Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm.*, **47**(3), 339-349 (2018).

Desarrollo de vectores génicos basados en polímeros sintéticos: PEI y PDMAEMA

Ivonne Lorena Díaz-Ariza¹, César Augusto Sierra¹, León Darío Pérez-Pérez^{1*}

¹ Grupo de Investigación en Macromoléculas, Departamento de Química, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá D.C., Colombia.

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

Recibido para evaluación: 14 de diciembre de 2017

Aceptado para publicación: 31 de mayo de 2018

RESUMEN

En años recientes hubo un auge del uso de terapias génicas para el tratamiento de enfermedades de gran incidencia, como el cáncer. Generalmente, estas se basan en la liberación de material genético como plásmidos, en el núcleo celular, con lo cual se corrige una función o se induce la producción de proteínas deficientes a nivel fisiológico. Para llevar a cabo la terapia génica se requiere de vectores capaces de encapsular el material genético y garantizar su entrega en el núcleo celular. Los polímeros catiónicos sintéticos han llamado la atención como vectores, debido a su capacidad de condensar ácidos nucleicos para formar partículas que los protegen de la degradación enzimática y facilitan su captación celular.

La polietilenimina y el polimetacrilato de *N,N*-dimetilaminoetiló son los polímeros catiónicos más eficaces para la administración génica. Sin embargo, estos requieren modificaciones químicas específicas para eliminar o disminuir algunas limitaciones tales como su alta citotoxicidad y baja biodegradabilidad. En este artículo se analizan algunas de estas modificaciones, enfocándose en avances recientes en el desarrollo de copolímeros anfífilos como precursores de nanopartículas usadas como vectores génicos.

Palabras clave: Terapia génica, vectores poliméricos, copolímeros anfífilos, polietilenimina, polimetacrilato de *N,N*-dimetilaminoetiló.

SUMMARY

Development of genetic vectors based on synthetic polymers: PEI and PDMAEMA

During recent years, the use of genetic therapies has taken relevance in the treatment of high-incidence diseases such as cancer. Usually, they are based on the release of genetic material, as plasmids, into the cell nucleus, which corrects a function or induces the production of a deficient protein at the physiological level. To carry out gene therapy, vectors capable of encapsulating the genetic material and guaranteeing its delivery in the target cell nucleus are required. Synthetic cationic polymers have attracted great attention as vectors due to their ability to condense nucleic acids to form particles that protect them from enzymatic degradation and facilitate their cellular uptake. Polyethylenimine and poly (*N*, *N*-dimethylaminoethyl methacrylate) are the most effective cationic polymers for gene delivery. However, these polymers require specific chemical modifications to either avoid or diminish their high cytotoxicity and low biodegradability. This review analyzes some of these modifications, focusing on recent advances in the development of amphiphilic copolymers as precursors of nanoparticles used as gene vectors.

Key words: Gene therapy, polymeric vectors, amphiphilic copolymers, polyethylenimine, poly (*N*, *N*-dimethylaminoethyl methacrylate).

INTRODUCCIÓN

Durante las últimas décadas, el cáncer se ha convertido en un problema de salud pública en aumento, encontrándose dentro de las primeras causas de muerte. En Colombia, por ejemplo, según el informe de Enfermedades Crónicas no Transmisibles del Observatorio Nacional de Salud, durante el periodo comprendido entre 2010 y 2014 se registraron un total de 132.799 casos nuevos de cáncer en mujeres y 174.638 en hombres. El cáncer se suma a otras enfermedades asociadas a factores hereditarios, tales como hipertensión arterial, diabetes *mellitus* y Alzheimer, que presentan altos niveles de incidencia y frente a las cuales no se dispone de tratamientos efectivos [1, 2].

La terapia génica figura como una de las alternativas más promisorias para el tratamiento de estas enfermedades y para el mejoramiento de las condiciones de vida de los pacientes [3]. Cuando se emplea este método, se libera material genético terapéutico, generalmente, plásmidos en el núcleo celular, permitiendo así corregir la pérdida

de una función por una mutación o expresar el producto de un gen deficiente a nivel fisiológico. La terapia génica inicia con la identificación del gen causante de la enfermedad, seguido de la clonación del gen sano, el cual se carga en un vector que debe tener la capacidad de ser captado por las células blanco, para finalmente liberar el material genético y producir una proteína en particular [4].

Durante los últimos años se han realizado más de 2000 ensayos clínicos empleando este tipo de terapia, en su mayoría, estos están direccionados al tratamiento de diferentes tipos de cáncer [5]. Dentro de las estrategias empleadas en la terapia génica de esta enfermedad se destacan la corrección de mutaciones, la supresión de la angiogénesis y el mejoramiento en la supresión tumoral [6].

Es necesario el uso de vehículos, conocidos como vectores, [7] debido a que los ácidos nucleicos libres presentan baja estabilidad química por su degradación enzimática y su eliminación por el sistema fagocítico. Consecuentemente, la selección del vector es uno de los parámetros que determina la eficacia de la terapia génica, ya que este debe ser biocompatible, soluble en medios acuosos, presentar tamaño nanométrico, poseer baja citotoxicidad y alta eficiencia de transfección [8].

En los comienzos de la terapia génica se empleaban vectores virales, como retrovirus y adenovirus, los cuales tienen una alta eficiencia de transfección; sin embargo, presentan varias limitaciones tales como toxicidad, inmunogenicidad y difícil producción, principalmente, a gran escala, requisito para su aplicación a nivel clínico [9]. Esto ha motivado el desarrollo de vectores tales como polímeros catiónicos sintéticos capaces de condensar moléculas de ácidos nucleicos a través de interacciones electrostáticas, formando partículas que protegen el material genético. Cuando se emplean vectores sintéticos, su desempeño depende de la estructura, composición y peso molecular del precursor polimérico, así como del tamaño de los agregados que forma con las cadenas de los ácidos nucleicos.

El polímero más empleado como vector génico y considerado como “estándar de oro” es la polietileneimina (PEI) debido a su alta eficiencia de transfección y habilidad de escape de los endosomas; sin embargo, su citotoxicidad y su baja biodegradabilidad limitan su aplicación [10]. De otro lado, como una alternativa, el polimetacrilato de N, N-dimetilaminoetilo (PDMAEMA, por sus siglas en inglés) —pese a presentar desventajas similares— es derivado de un monómero acrílico, lo que permite controlar de manera precisa su arquitectura y peso molecular y por ende, atenuar su toxicidad y baja biodegradabilidad, manteniendo así un desempeño comparable al PEI [11].

Dada la eficiencia de estos polímeros como vectores de ácidos nucleicos, se han estudiado varias estrategias para mejorar su actividad de transfección y reducir su toxicidad.

De estas se destaca el uso de arquitecturas ramificadas y la copolimerización con segmentos hidrofóbicos; varias investigaciones han mostrado que este tipo de estructura posee una mayor capacidad de internalización celular y una disminución significativa en la citotoxicidad [12, 13].

Por su parte, la copolimerización con segmentos hidrófobos conlleva a la obtención de materiales anfífilicos, que se autoensamblan en medio acuoso dando lugar a la formación de nanopartículas tipo micela. Este tipo de estructura, además de aumentar la estabilidad de los complejos polímero/ácido nucleico, ofrece la posibilidad de controlar propiedades como tamaño y carga de las partículas a través de la composición del copolímero. Adicionalmente, las nanopartículas pueden actuar como reservorios de fármacos con baja solubilidad en agua permitiendo la liberación tanto del fármaco como del ácido nucleico terapéutico [7].

En las siguientes secciones se describe la aplicación de materiales basados en PEI y PDMAEMA como vectores para la transfección de ácidos nucleicos, enfatizando en la aplicación de copolímeros anfífilicos formados con poliésteres alifáticos en el campo de la terapia génica.

VECTORES EN TERAPIA GÉNICA

La terapia génica es un método experimental para el tratamiento de varias enfermedades que consiste en reemplazar o anular genes defectuosos por genes normales, a través de la transfección de ácidos nucleicos en células específicas. Generalmente, la información genética se encuentra codificada en un plásmido, aunque también se pueden utilizar otras formas de ADN o ARN. El principal requisito para el uso terapéutico de estas sustancias es su entrega en los compartimientos celulares donde cumple su función y para que esto ocurra, deben superar una serie de barreras extra e intracelulares. Sin embargo, esto es poco probable debido a que los ácidos nucleicos sufren una degradación enzimática rápida [7]. Por esta razón, es necesario el uso de vehículos de entrega (vectores), que deben transportar los ácidos nucleicos hasta su sitio de acción (ver figura 1) [14].

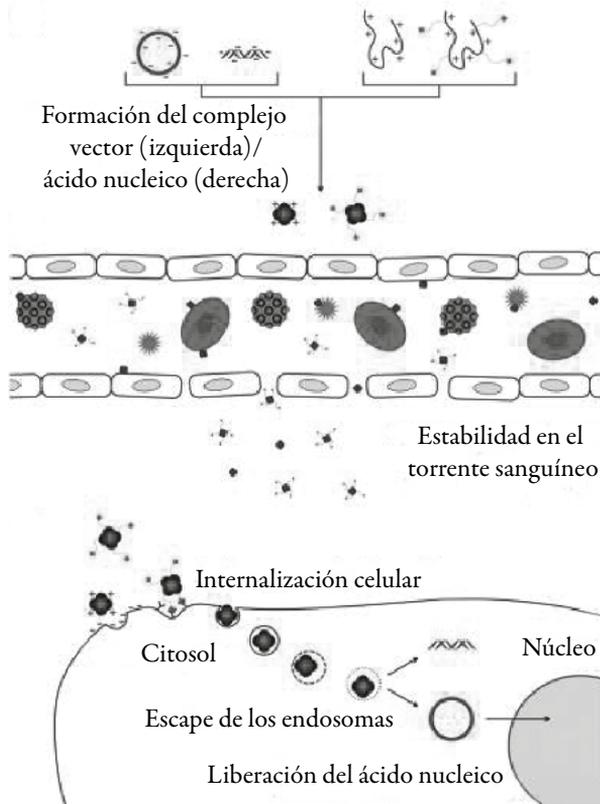


Figura 1. Barreras extra e intracelulares para la entrega de ácidos nucleicos [14].

Varios sistemas de transporte han sido desarrollados entre los que se destacan los vectores virales y los vectores no virales. Los sistemas virales consisten en virus recombinantes, el ácido nucleico terapéutico se inserta en su genoma y se aprovecha la vía de infección para su transfección; en este caso, se evita la expresión de genes que conducen a la replicación y la toxicidad, suprimiendo las regiones que codifican para estas funciones. A pesar de que estos vectores ofrecen mayores eficiencias de transfección, sus limitaciones en cuanto a toxicidad, respuesta inmune severa, cantidad de ADN insertado y dificultad en su producción han restringido su aplicación en terapia génica [15]. Por su parte, los vectores no virales son sistemas de entrega de genes formados por la combinación de ácidos nucleicos con lípidos catiónicos, llamados lipoplejos o con polímeros catiónicos, también denominados poliplejos. Estos materiales catiónicos se ensamblan con los ácidos nucleicos para formar partículas que facilitan su internalización en la célula vía endocitosis [16].

Los lípidos catiónicos han sido usados como agentes de transfección debido a su capacidad de internalización celular y desestabilización de los endosomas; al entrar en la

célula neutralizan las cargas del complejo, debido a una reorganización de los fosfolípidos, causando la liberación del ADN en el citoplasma [3]. Estas sustancias constan de una cabeza cargada positivamente, un segmento hidrófobo y un grupo enlazante; la cabeza positiva puede ser monovalente o multivalente, dependiendo de la cantidad de grupos amina que contenga. Se han estudiado varias modificaciones tanto de la naturaleza y densidad de los grupos catiónicos, como del segmento hidrófobo para mejorar su desempeño en la entrega de ácidos nucleicos [17]. En la figura 2 se muestran las estructuras de los lípidos catiónicos más utilizados en este campo [18]. Aunque algunas modificaciones estudiadas han mejorado el desempeño de estas sustancias en la entrega de ADN, problemas como la baja especificidad, la inestabilidad frente a algunos componentes de la sangre, la generación de respuesta inmune y la necesidad de emplear lípidos auxiliares han limitado su empleo como vectores [6].

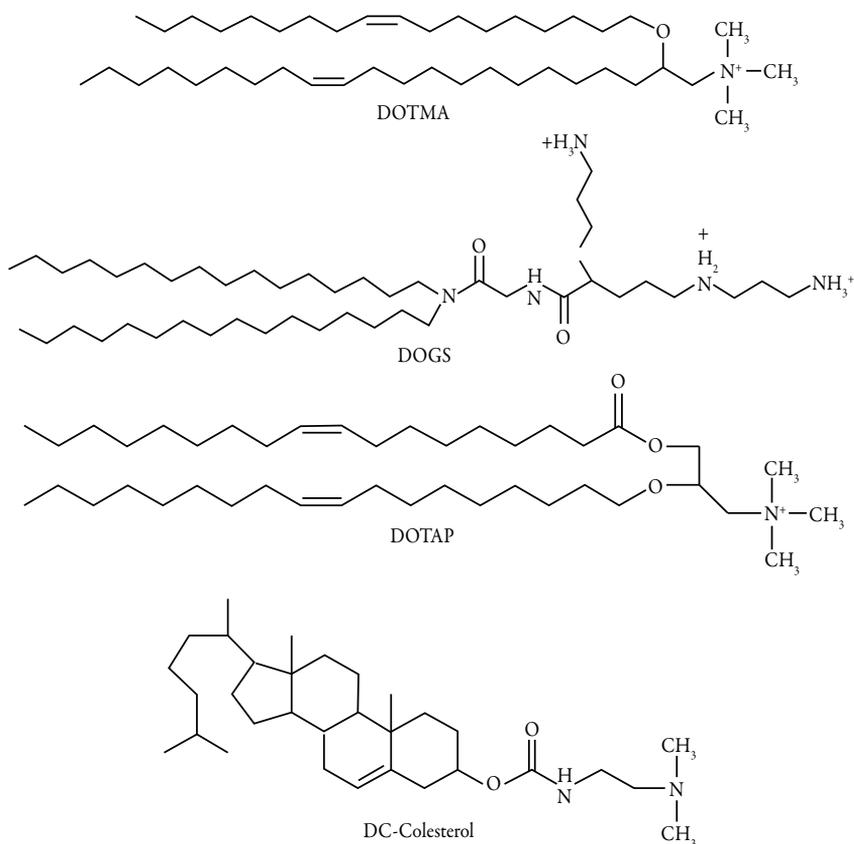


Figura 2. Estructuras de algunos lípidos catiónicos empleados en terapia génica. DOTMA: cloruro de *N* [1-(2,3-dioleiloxi propil)- *N*, *N*, *N*-trimetilamonio]; DOGS: Dioctadecilamido glicil espermina; DOTAP: 1,2-dioleil-3-trimetilamonio-propano; DC-Colesterol: [*N*-(*N*', *N*'-dimetilamino etano)-carbamoil] colesterol.

En cuanto a los tipos de ácido nucleico, los más utilizados para formar complejos con los diferentes vectores son el ADN plasmídico (ADNp) y el ARN pequeño de interferencia (siRNA, por sus siglas en inglés). Los ADNp son moléculas circulares de doble cadena que tienen un tamaño estándar entre 4-10 kilobases de pares de bases, los cuales codifican para la expresión de proteínas específicas. Los ADNp presentan ventajas como estabilidad, facilidad de manipulación y bajo costo en comparación con los otros tipos de ácidos nucleicos, además han sido usados en el desarrollo de vacunas para enfermedades como la malaria y el síndrome de inmunodeficiencia adquirido [19]. Sin embargo, se ha demostrado que la eficiencia de transfección del ADNp es menor porque se requiere la entrada de las moléculas al interior del núcleo celular. Por esta razón se han estudiado varias modificaciones en los plásmidos para mejorar su internalización celular y posterior expresión del gen como: la producción de nuevas topologías (como la superenrollada), el empleo de nuevos promotores y la generación de plásmidos sin genes de resistencia a antibióticos [6].

De otro lado, los siRNA son moléculas cortas de doble cadena compuestas de 21-23 nucleótidos, las cuales degradan selectivamente ARN mensajero de secuencia complementaria, inhibiendo su traducción a proteína [7]. Este proceso de interferencia ocurre en el citoplasma, lo que hace a estos sistemas más versátiles que el ADNp, eliminando la necesidad de llevar el material genético al núcleo celular, además pueden ser sintetizados químicamente y no se integran al genoma, ofreciendo una mayor seguridad. El empleo de este tipo de ácido nucleico tiene desventajas como la supresión de genes diferentes al blanco y el reconocimiento por inmunoreceptores, lo que conlleva a alteraciones en la expresión de los genes y respuesta del sistema inmune innato [20, 21]. Además, por su tamaño y estructura, la habilidad de formar complejos es menor ya que se presentan menos interacciones electrostáticas con el vector, lo cual puede afectar la estabilidad del polielectrolito [7].

En el tratamiento del cáncer se han explorado diferentes estrategias, empleando tanto vectores virales como no virales, tales como la supresión y el reemplazo de genes [22], el uso de material genético para la inducción de muerte celular [23], la inhibición de factores de transcripción [24] y la estimulación de la respuesta inmune contra tumores [25], las cuales han permitido lograr efectos anticancerígenos significativos. Debido a las limitaciones de los sistemas virales y lipídicos, la investigación de vectores poliméricos aplicados en el tratamiento de esta enfermedad ha traído consigo grandes avances, los cuales han permitido un mejor entendimiento de las propiedades que deben tener tanto para atravesar las barreras sistémicas y celulares, como para entregar de manera eficiente el material genético dentro de la célula. Esto ha posibilitado que varios vectores poliméricos hayan sido aplicados en la transfección de ácidos nucleicos en ensayos clínicos mostrando resultados exitosos en la terapia del cáncer (ver tabla 1).

Tabla 1. Vectores poliméricos en terapia génica del cáncer bajo ensayos clínicos [6, 14, 26].

Vector polimérico	Ácido nucleico	Tipo de cáncer	Fase clínica
Transferrina-Poli(lisina) (AVET)	IL-2	Melanoma	Primer polímero en terapia génica humana
PEI	Toxina diftérica-A, DTA-H19, SNS01-T	Cáncer de vejiga, mieloma múltiple, linfoma	IIb (vejiga), II (mieloma y linfoma)
PEG-PEI-Colesterol	IL-12, CYL-02	Cáncer de ovario, adenocarcinoma pancreático	I
Polímero LODER	KRAS	Cáncer pancreático	II
Transferrina-PEG-Ciclodextrina	siRNA anti-MMR2	Tumores sólidos	I

Los avances en terapia génica, tanto del cáncer como de otras enfermedades de origen genético, dependen del desarrollo de materiales poliméricos capaces de vectorizar el ADN/ARN con toxicidad e inmunogenicidad reducida; ello se logra controlando su estructura, composición, arquitectura y peso molecular como se discutirá más adelante.

VECTORES POLIMÉRICOS

Durante los últimos años, algunos polímeros catiónicos han sido estudiados como vectores no-virales en el tratamiento de enfermedades como fibrosis quística, virus de inmunodeficiencia humana y cáncer [27-29]. Estos vectores son interesantes porque ofrecen ventajas tales como menor riesgo inmunogénico, además, se obtienen por procesos más sencillos y su estructura es modificable [30]. Se caracterizan por poseer grupos funcionales amina que pueden protonarse parcialmente a pH fisiológico lo que les permite interactuar electrostáticamente con el ácido nucleico.

Los vectores poliméricos se pueden clasificar en naturales y sintéticos. Los polímeros catiónicos naturales han sido empleados como transportadores de genes debido a su capacidad de formar complejos con ácidos nucleicos, presentando biocompatibilidad y biodegradabilidad. Materiales como el quitosano, la gelatina, el dextrano, la celulosa y las ciclodextrinas han mostrado la habilidad de condensar el material genético y entregarlo dentro de la célula con baja toxicidad e inmunogenicidad, sin embargo, se han evidenciado problemas de solubilidad y baja eficiencia de transfección, lo que hace que se encuentren en desventaja con respecto a los polímeros sintéticos [10].

El quitosano es el polímero catiónico natural más empleado debido a su baja citotoxicidad y alta densidad de grupos funcionales; es un polisacárido compuesto por

D-glucosamina y *N*-acetil-glucosamina, cuya eficiencia de transfección depende del grado de deacetilación, el peso molecular y el pH (pKa 6,5) [31]. Sin embargo, su baja solubilidad en medios acuosos a pH fisiológico, tendencia a la agregación y baja estabilidad hacen que su manejo y aplicabilidad siga siendo limitada [32].

El uso de polímeros catiónicos sintéticos ha permitido superar los inconvenientes encontrados con los materiales naturales debido a que puede ejercerse un mejor control sobre sus propiedades a partir de modificaciones en su estructura. Por ejemplo, la introducción de grupos funcionales y segmentos, el empleo de homopolímeros o copolímeros, la variación en la arquitectura molecular (lineal, injertada, tipo estrella, entre otras) y el control del peso se puede lograr mediante el seguimiento de rutas sintéticas predeterminadas [33]. Entre los polímeros estudiados como vectores sintéticos se incluyen: poli-L-lisina (PLL), poliamido aminas (PAAs), poliamino ésteres (PAEs), PEI y PDMAEMA. Las características generales de los primeros tres polímeros se muestran en la tabla 2. Dadas las desventajas que presentan —como toxicidad, baja eficiencia de transfección o dificultades desde el punto de vista sintético— es necesario el uso de polímeros más versátiles como el PEI y el PDMAEMA, los cuales serán objeto de revisión en las secciones siguientes.

Tabla 2. Características generales de los polímeros catiónicos sintéticos empleados en la transfección de ácidos nucleicos.

Polímero	Estructura	Características
PLL	<p>The structure shows a polymer backbone with a repeating unit $\left[\text{NH} - \text{CH}(\text{R}) - \text{CO} \right]_n$. The side chain consists of a CH_2 group followed by a CH_2 group, then a CH_2 group attached to a nitrogen atom. This nitrogen atom is also bonded to a hydrogen atom and a CH_2 group, which is further attached to another CH_2 group, and finally to a terminal primary amine group (NH_2).</p>	<ul style="list-style-type: none"> -Homopolímero del aminoácido L-lisina. -Forma complejos con el ADN. -Presenta baja eficiencia de transfección dada su baja habilidad de escape de los endosomas [10].
PAAs	<p>The structure shows a polymer backbone with a repeating unit $\left[\text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{C}(=\text{O}) - \text{N}(\text{R}_2) - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{C}(=\text{O}) - \text{N}(\text{R}_2) - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{N}(\text{R}_3) \right]_n$.</p>	<ul style="list-style-type: none"> -Polímeros catiónicos con grupos amino terciarios. -Biodegradables y solubles en medios acuosos. - Altamente citotóxicos a altos pesos moleculares. -No forman complejos estables con ácidos nucleicos pequeños como el siRNA [10, 34].
PAEs	<p>The structure shows a polymer backbone with a repeating unit $\left[\text{R} - \text{O} - \text{C}(=\text{O}) - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{N}(\text{R}_1) - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{C}(=\text{O}) - \text{O} \right]_n$.</p>	<ul style="list-style-type: none"> -Poliésteres con grupos amino. -Biodegradable. -Presentan alta eficiencia de transfección. -Poco reactivo, lo cual dificulta su modificación química [35].

VECTORES BASADOS EN PEI

El PEI es uno de los polímeros catiónicos sintéticos más estudiados como agente de transfección de ácidos nucleicos debido a su alta eficiencia y habilidad de escape de los endosomas. Este puede ser sintetizado en forma lineal (lPEI), la cual contiene solo aminas secundarias o en la forma ramificada (bPEI) que contiene grupos amino primarios, secundarios y terciarios (figura 3) [10].

El uso de homopolímeros de PEI en la transfección de ácidos nucleicos ha sido objeto de diversas investigaciones, las cuales han mostrado que al incrementar el peso molecular del polímero aumenta la eficiencia de transfección, pero también se presenta un incremento en la citotoxicidad [36, 37]. Se ha encontrado que los homopolímeros de PEI de alto peso molecular y alto grado de ramificación forman complejos estables con ácidos nucleicos, presentando buenas eficiencias de transfección; sin embargo, la forma lineal los libera más fácilmente, entregándolos de forma más efectiva al citoplasma o al núcleo [27]. Pese a la eficiencia del PEI como vector génico su carácter no degradable y citotoxicidad asociada ha limitado sus aplicaciones terapéuticas [15].

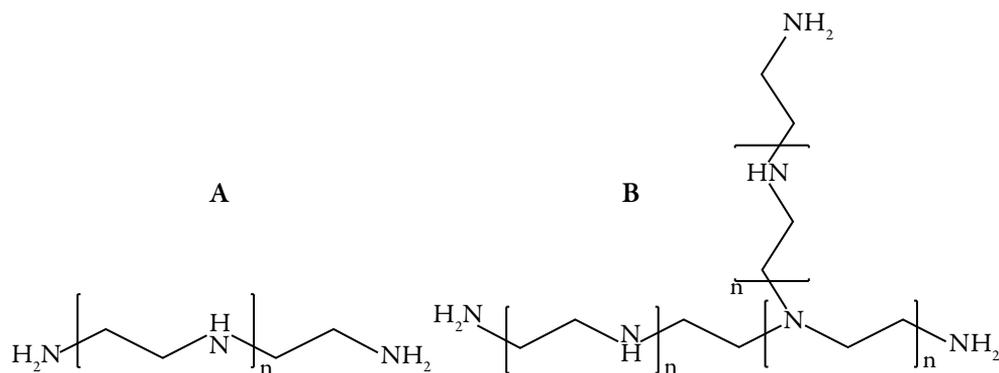


Figura 3. Estructuras químicas del PEI. **A.** PEI lineal, **B.** PEI ramificado.

Para superar estos inconvenientes, uno de los enfoques que ha mostrado mejores resultados es su copolimerización con segmentos biocompatibles, tales como polietilenglicol (PEG), dextrano y quitosano. La pegilación es una estrategia muy empleada en el desarrollo de vectores ya que les provee mayor biocompatibilidad y estabilidad; el PEG es un segmento hidrofílico protector que previene interacciones indeseables con componentes de la sangre u otras biomoléculas; adicionalmente, le confiere estabilidad coloidal a las partículas que forma cuando el polímero interacciona con el ADN o ARN [14, 38].

Por ejemplo, Merdan *et al.* [39] encontraron que la pegilación del PEI reduce la interacción de los complejos resultantes con las proteínas del plasma y los eritrocitos, lo que repercute en un incremento en su biocompatibilidad. Resultados similares son reportados por Mao *et al.* [40] quienes encontraron que los poliplejos, obtenidos a partir de PEI-*g*-PEG, copolímero injertado (*g*= graft, del inglés), presentan mayores tiempos de circulación y menor toxicidad que el PEI homopolímero y que a su vez, la eficiencia de transfección depende de la longitud de las cadenas de PEG y la densidad de injerto.

Por otro lado, Fischer *et al.* [41] investigaron las propiedades de copolímeros de dextrano-*g*-PEI, y encontraron que el dextrano aumenta la habilidad de complejación y estabilización del ADN, además de producir materiales no tóxicos. También se ha reportado la síntesis de copolímeros de PEI-quitosano para la formación de complejos con ADN, los cuales mostraron mayores eficiencias de transfección y menor citotoxicidad que el complejo PEI/ADN, además de mostrar una reducción en las interacciones con eritrocitos [42].

COPOLÍMEROS ANFIFÍLICOS DE PEI

Una de las estrategias que ha mostrado ser efectiva para disminuir la toxicidad y aumentar la eficiencia de transfección del PEI es el empleo de copolímeros con sustancias hidrófobas como los poliésteres alifáticos. Estos polímeros se caracterizan por su biocompatibilidad y biodegradabilidad; dentro de los más empleados se encuentran la poli(ϵ -caprolactona) (PCL) y la polilactida (PLA), sustancias aprobadas por la agencia americana de regulación de medicamentos y alimentos, la FDA (Food and Drug Administration) para aplicaciones biomédicas [43, 44]. De esta manera se obtienen materiales anfifílicos que se caracterizan por su capacidad de autoensamblarse con el ADN/ARN y formar nanopartículas como micelas.

Se han estudiado copolímeros basados en PCL y PEI con diferente arquitectura. Cao *et al.* [45] reportaron el uso de micelas obtenidas a partir de PCL-*b*-IPEI, copolímero en bloque (*b*= block, del inglés), como vectores de siRNA y doxorrubicina (Dox) en células de cáncer hepático humano, estos materiales exhibieron alta eficiencia de transfección y liberación controlada del fármaco. Asimismo, se han obtenido nanopartículas micelares basadas en copolímeros de injerto PEI-*g*-PCL (PEC) de diferentes pesos moleculares aplicadas en la entrega de ADNp y Dox; los complejos obtenidos mostraron baja citotoxicidad en células HepG2 a una relación nitrógeno/fósforo (N/P) de 10, tal como se deduce de los valores de viabilidad celular presentados en la figura 4 en función de la concentración del complejo. De acuerdo con Qiu *et al.* [46], los copolímeros estudiados presentan mejores eficiencias de transfección que el PEI 25 kDa.

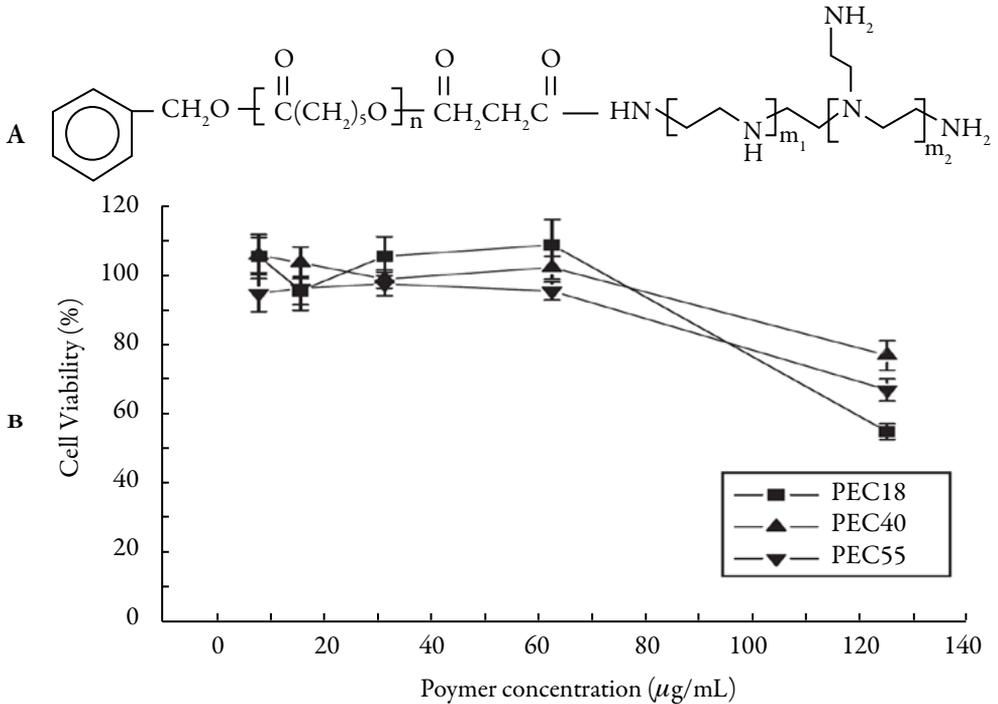


Figura 4. A. Estructura de los copolímeros PEC. **B.** Viabilidad de células HepG2 tras adición de concentraciones crecientes de PEC acomplejado con ADN a una relación N/P 10, luego de 4 horas de incubación ($n=6$) [46].

La incorporación de un segmento hidrófilo de PEG es una estrategia empleada para mejorar el desempeño de los copolímeros anfífilicos como vectores. Endres *et al.* [47] reportan la síntesis de copolímeros tribloque anfífilicos m PEG-*b*-PCL-*b*-IPEI (m =metoxi) y su aplicación como nanotransportadores de siRNA; sus resultados indican una mejor eficiencia de transfección cuando se emplean segmentos cortos de PEG. Zheng y Liu *et al.* [48-50] obtuvieron micelas basadas en copolímeros ramificados de PEI-*g*-PCL-*b*-PEG, encontrando que la longitud de los segmentos poliméricos y la densidad de *grafting* afectan las propiedades de los complejos con ADN y con siRNA. Adicionalmente, establecieron relaciones entre la composición de los copolímeros y su eficiencia de transfección, tal como se muestra en la figura 5, además, se presenta el efecto de la relación N/P sobre cada una de las composiciones estudiadas. También se ha reportado la síntesis de copolímeros PEG-*b*-(PCL-*g*-PEI)-*b*-PCL para la formación de micelas aplicadas en la coliberación de siRNA y Dox; los resultados mostraron que las nanopartículas pueden entregar de manera efectiva estas sustancias inhibiendo el crecimiento de tumores resistentes a múltiples fármacos, específicamente en células de cáncer de mama resistentes a Dox [51].

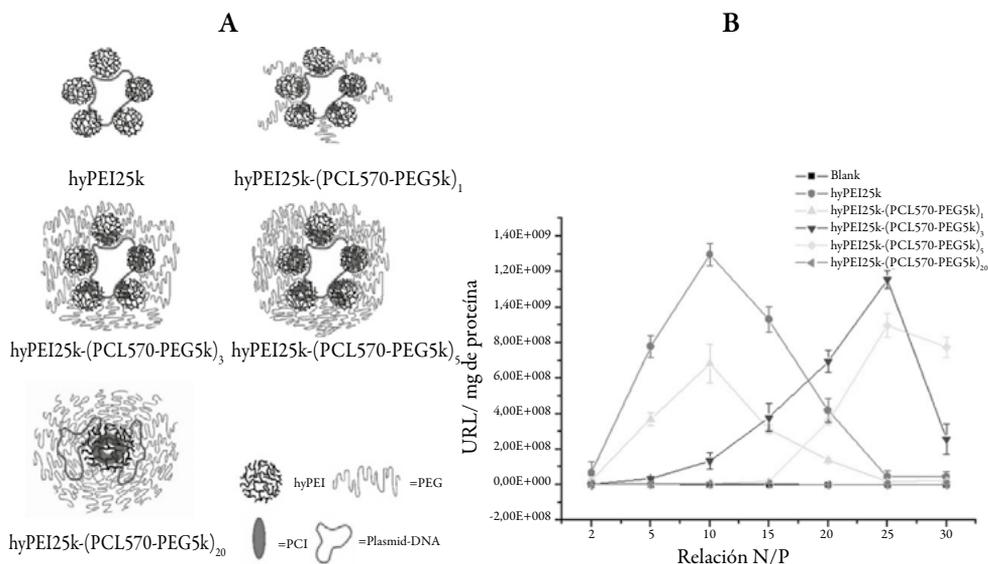


Figura 5. A. Conformación de los poliplejos hyPEI-g-PCL-b-PEG. **B.** Eficiencias de transfección de los polímeros evaluados en células de melanoma humano (MeWo) empleando ADNp que contiene el gen reportero de luciferasa en función de la relación N/P [48].

Además de PCL como segmento hidrófobo, también se han reportado materiales que contienen PLA, como en la investigación realizada por Coulembier *et al.* [52], donde se obtuvieron copolímeros de injerto PEI-g-PLA para la formación de nanopartículas, las cuales mostraron una buena penetración celular y podrían tener potencial aplicación en la entrega de genes. Igualmente, Gaspar *et al.* [53] estudiaron la coliberación de ADN y Dox mediante el uso de micelas basadas en copolímeros en bloque de poli(2-etil-2-oxazolina)-b-poli(L-lactida)-g-poli(etilenoimina) bioreducible (PEOz-b-PLA-g-PEI-SS), estas nanopartículas mostraron captación celular favorable y expresión de genes que codifican para luciferasa de luciérnaga y proteína verde fluorescente (PVF), tanto en pruebas *in vitro* como *in vivo*.

VECTORES BASADOS EN PDMAEMA

Los vectores basados en PDMAEMA han despertado gran interés por su alta eficiencia de transfección y fácil disociación del ácido nucleico dentro de la célula. Este polímero catiónico se caracteriza por poseer grupos amino terciarios parcialmente protonados a pH fisiológico (pKa ~ 7,5), lo que le permite actuar como agente de transfección de ADN/ARN [54]. Generalmente se sintetiza mediante metodologías de polimerización radicalaria controlada, tales como polimerización radicalaria por transferencia de átomo (ATRP) (ver figura 6).

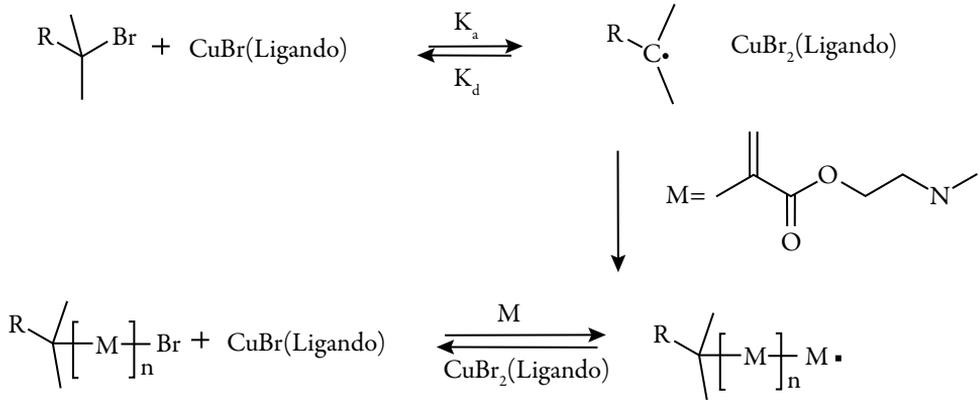


Figura 6. Síntesis de PDMAEMA vía ATRP. En este tipo de polimerización un haluro de alquilo actúa como iniciador, generando radicales libres a partir de una ruptura homolítica del enlace C-X, dicho proceso es reversible y presenta constantes cinéticas de activación (k_a) y desactivación (k_b).

La estructura de varios homopolímeros de PDMAEMA y su influencia en la eficiencia de transfección de ácidos nucleicos ha sido objeto de diversas investigaciones, donde se han abordado aspectos como el efecto del peso molecular, tamaño de las partículas, pH, temperatura y relación polímero/plásmido, expresada como relación N/P [55]. Para el PDMAEMA lineal como vector de ADN se ha determinado que al incrementar el peso molecular del polímero se presenta mayor eficiencia de transfección, pero también incrementa la citotoxicidad [56].

Müller *et al.* [57] compararon el desempeño de muestras de PDMAEMA con arquitecturas diferentes: lineal y tipo estrella de tres y cinco brazos con diferente peso molecular; de acuerdo con sus resultados, la citotoxicidad es menor a bajos pesos y cuando incrementa el número de brazos. Sin embargo, las mejores eficiencias de transfección se obtienen para polímeros de alto peso molecular. De acuerdo con este estudio, polímeros con una estructura ramificada y pesos intermedios (mayor a 20 kDa) son los que presentan mejores resultados como sistemas de transfección de genes. Aunque los homopolímeros poseen alta eficiencia de transfección, su toxicidad sigue siendo un parámetro crítico que limita su aplicación.

Como en el caso del PEI, la copolimerización es una de las estrategias utilizadas para aumentar la eficiencia de transfección y reducir la toxicidad de los vectores basados en PDMAEMA. Se han reportado diversos estudios que incluyen su copolimerización con sustancias como PEG [58], poli(2-hidroxietil metacrilato) (pHEMA) [59], poli(*N*-vinilpirrolidona) (PVP) [60] e hidroxipropil celulosa (HPC) [61], para ser aplicados en la entrega de diferentes tipos de ácidos nucleicos.

La pegilación del PDMAEMA conlleva a disminuir su citotoxicidad, aunque también se reduce su eficiencia de transfección debido a una menor captación celular de los complejos [58]. En tanto, en el estudio realizado por Jiang *et al.* [59] los vectores obtenidos a partir de copolímeros de injerto pHEMA-*g*-PDMAEMA presentan mejor desempeño que el correspondiente homopolímero, mientras que se reduce su toxicidad. Resultados similares son obtenidos para la copolimerización con PVP y HPC [60, 61].

COPOLÍMEROS ANFIFÍLICOS DE PDMAEMA

La copolimerización del PDMAEMA con segmentos hidrofóbicos biodegradables también ha mostrado ser una herramienta útil para optimizar las propiedades de estos sistemas. Estos segmentos, dado su carácter biodegradable, facilitan la descomposición del vector al interior de la célula, generando moléculas de menor peso que son menos citotóxicas y que pueden ser fácilmente depuradas.

En la aplicación como vectores, la copolimerización con segmentos hidrófobos de PCL y PLA ha sido ampliamente estudiada. Guo *et al.* [62] reportan la obtención de copolímeros PCL-*g*-PDMAEMA, los cuales se autoensamblan para formar nanopartículas tipo *core-shell* capaces de encapsular moléculas de paclitaxol y ADN. Estas nanopartículas mostraron eficiencias de transfección *in vitro* comparables con la Lipofectamina, una formulación comúnmente empleada en experimentos de transfección; sin embargo, este tipo de estructuras no mostraron reducciones significativas en la citotoxicidad. La modificación superficial con cadenas de poli(ácido glutámico)-*g*-PEG es una estrategia reportada por Huang *et al.* [63] para reducir la citotoxicidad del PDMAEMA y mejorar la estabilidad de sus complejos con ADN.

También, trabajando con paclitaxol, Zhu *et al.* [64] sintetizaron copolímeros tribloque PDMAEMA-*b*-PCL-*b*-PDMAEMA, empleándolos como precursores de micelas poliméricas, a las cuales se les evaluó la eficiencia de transporte y entrega del medicamento. Se observó que la presencia de PCL copolimerizado con segmentos de PDMAEMA de bajo peso molecular disminuye la citotoxicidad de los vectores resultantes, tal como se muestra en la figura 7. Adicionalmente, mejoró la eficiencia en el silenciamiento de genes en comparación con los homopolímeros de PEI 25 kDa y PDMAEMA 20 kDa. Este comportamiento fue corroborado por Yue *et al.* [65], quienes emplearon nanopartículas basadas en *m*PEG-*b*-PCL-*b*-PDMAEMA como vectores de ADNp y encontraron que la inclusión del segmento hidrofóbico aumenta significativamente la eficiencia de transfección.

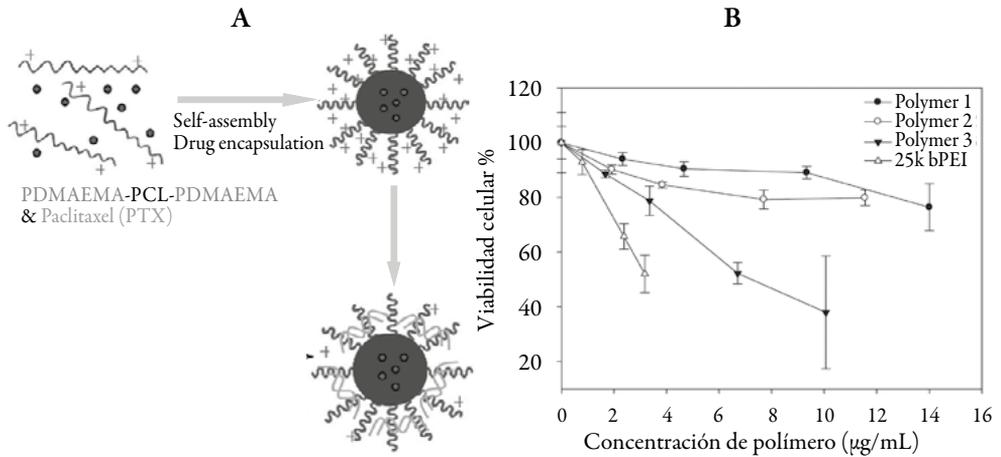


Figura 7. A. Formación de los poliplejos cargados con paclitaxol. **B.** Citotoxicidad de las micelas PDMAEMA-*b*-PCL-*b*-PDMAEMA en células de cáncer de mama humano MDA-MB-435-GFP. Las células fueron tratadas por 24 horas y se midió la actividad metabólica ($n=3$). *Polymer 1*, *Polymer 2* y *Polymer 3* hacen referencia a distintas relaciones molares de los monómeros en los bloques constituyentes DMAEMA:CL:DMAEMA de 2,7-3,6-2,7; 5,8-3,6-5,8 y 9,1-3,6-9,1, respectivamente [64].

Además de la composición de los copolímeros, su arquitectura molecular también juega un papel importante, tal como se demostró en el estudio realizado por Lin *et al.* [12], en el que compararon copolímeros en bloque lineales y de injerto basados en *m*PEG, PCL y PDMAEMA como vectores de siRNA. Sus resultados mostraron que los copolímeros de injerto presentan mayor captación celular en comparación con el copolímero en bloque, lo cual se atribuyó a que las nanopartículas que forma presentan valores más altos de potencial zeta y por lo tanto mayor carga superficial. Un copolímero similar, *m*PEG-*b*-PCL-*g*-PDMAEMA (PECD), fue sintetizado por Guo *et al.* [13] con el fin de obtener nanopartículas micelares para la entrega de plásmidos que codifican tanto para luciferasa como para PVF, obteniendo mejores eficiencias de transfección que el PEI y la lipofectamina en células HepG2, tal como se muestra en la figura 8B y se deduce de la imágenes de microscopía de fluorescencia en la figura 8C .

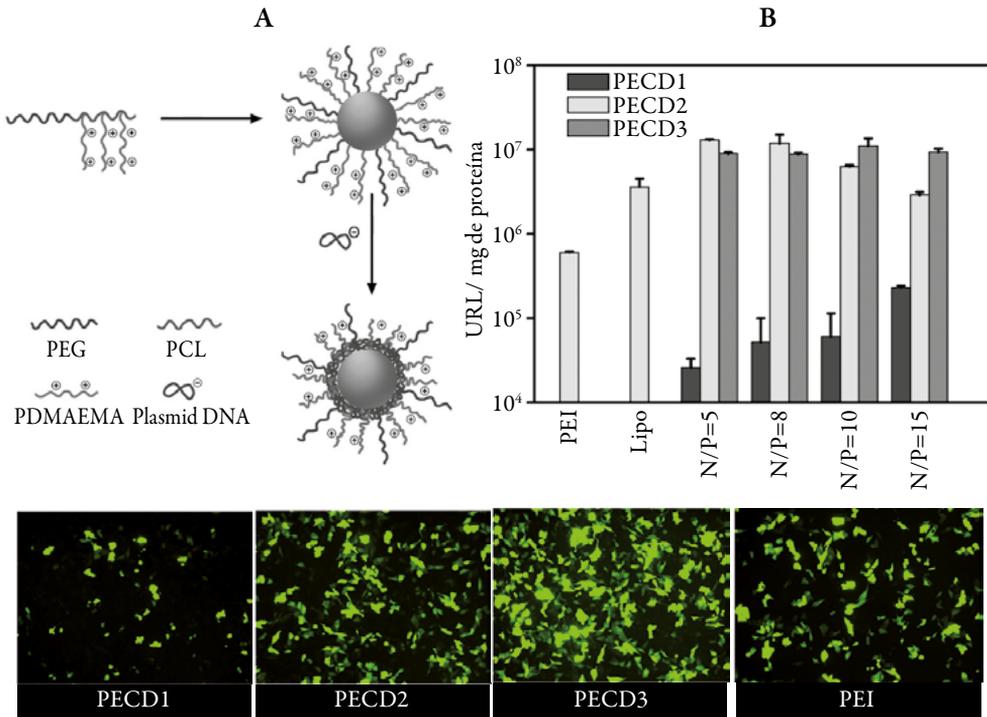


Figura 8. A. Representación esquemática de la preparación de los complejos PECD/ADNp. **B.** Eficiencias de transfección *in vitro* de nanopartículas PECD complejadas con ADNp (luciferasa) a varias relaciones N/P. **C.** Imágenes de fluorescencia de células transfectadas con complejos PECD/ADNp (PVF) a una relación N/P = 10 (escala 30 μ m). Composición de los copolímeros: **PECD1:** mPEG₄₅-P(CL₁₀₄-co-(BMPCL-g-PDMAEMA₁₁)₄); **PECD2:** mPEG₄₅-P(CL₁₀₄-co-(BMPCL-g-PDMAEMA₂₃)₄); **PECD3:** mPEG₄₅-P(CL₁₀₄-co-(BMPCL-g-PDMAEMA₃₉)₄) [13].

De manera similar, Kang *et al.* [66] trabajando con PLA y PDMAEMA sintetizaron copolímeros anfífilos en forma de estrella los cuales fueron estudiados para la coentrega de RNA y Dox. Sus resultados mostraron que la eficiencia en la transfección de las nanopartículas micelares resultantes depende de la arquitectura molecular, donde los copolímeros con mayor número de ramificaciones exhibieron las eficiencias más altas.

CONCLUSIONES

La implementación de vectores génicos basados en polímeros sintéticos tales como PEI y PDMAEMA ha tenido un gran desarrollo durante las últimas décadas, ya que pese a su citotoxicidad y baja biodegradabilidad presentan alta eficiencia de transfección.

Se ha demostrado que modificaciones químicas, tales como la introducción de segmentos poliméricos biodegradables y la obtención de estructuras moleculares ramificadas, permiten mejorar su eficiencia en la transfección de material genético y reducir su citotoxicidad. Aunque este tipo de materiales son promisorios para su aplicación en el campo de la terapia génica, es necesario adelantar estudios interdisciplinarios con el fin de caracterizar los fenómenos involucrados en la entrega de los ácidos nucleicos, además de establecer relaciones entre la estructura de los polímeros y sus propiedades como vectores, con el fin de optimizar su desempeño en el campo de la terapia génica.

CONFLICTO DE INTERESES

Los autores no declaran conflicto de intereses.

REFERENCIAS

1. M.L. Ospina, J.A. Huertas, J.I. Montaña, J.C. Rivillas, Observatorio Nacional de Cáncer Colombia/ Observatorio Nacional de Cáncer Colombia, *Revista de la Facultad Nacional de Salud Pública*, **33**, 262 (2015).
2. R. Lozano, M. Naghavi, K. Foreman *et al.*, Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010, *The Lancet*, **380**, 2095 (2012).
3. M.A. Mintzer, E.E. Simanek, Nonviral vectors for gene delivery, *Chemical Reviews*, **109**, 259 (2008).
4. L. Naldini, Gene therapy returns to centre stage, *Nature*, **526**, 351 (2015).
5. N. Bertrand, J. Wu, X. Xu, N. Kamaly, O.C. Farokhzad, Cancer nanotechnology: the impact of passive and active targeting in the era of modern cancer biology, *Advanced Drug Delivery Reviews*, **66**, 2 (2014).
6. J. Pahle, W. Walther, Vectors and strategies for nonviral cancer gene therapy, *Expert Opinion on Biological Therapy*, **16**, 443 (2016).
7. X.Q. Liu, C.Y. Sun, X.Z. Yang, J. Wang, Polymeric-micelle-based nanomedicine for siRNA delivery, *Particle & Particle Systems Characterization*, **30**, 211 (2013).
8. A. Falamarzian, X.B. Xiong, H. Uludag, A. Lavasanifar, Polymeric micelles for siRNA delivery, *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, **22**, 43 (2012).

9. M. Ramamoorth, A. Narvekar, Non viral vectors in gene therapy an overview, *Journal of Clinical and Diagnostic Research: JCDR*, **9**, GE01 (2015).
10. S.K. Samal, M. Dash, S. Van Vlierberghe, D.L. Kaplan, E. Chiellini, C. Van Blitterswijk, L. Moroni, P. Dubruel, Cationic polymers and their therapeutic potential, *Chemical Society Reviews*, **41**, 7147 (2012).
11. O. Samsonova, C. Pfeiffer, M. Hellmund, O.M. Merkel, T. Kissel, Low molecular weight pDMAEMA-block-pHEMA block-copolymers synthesized via RAFT-polymerization: potential non-viral gene delivery agents?, *Polymers*, **3**, 693 (2011).
12. D. Lin, Y. Huang, Q. Jiang, W. Zhang, X. Yue, S. Guo, P. Xiao, Q. Du, J. Xing, L. Deng, Structural contributions of blocked or grafted poly (2-dimethylaminoethyl methacrylate) on PEGylated polycaprolactone nanoparticles in siRNA delivery, *Biomaterials*, **32**, 8730 (2011).
13. S. Guo, Y. Huang, T. Wei, W. Zhang, W. Wang, D. Lin, X. Zhang, A. Kumar, Q. Du, J. Xing, Amphiphilic and biodegradable methoxy polyethylene glycol-block-(polycaprolactone-graft-poly (2-(dimethylamino) ethyl methacrylate)) as an effective gene carrier, *Biomaterials*, **32**, 879 (2011).
14. U. Lächelt, E. Wagner, Nucleic acid therapeutics using polyplexes: a journey of 50 years (and beyond), *Chemical Reviews*, **115**, 11043 (2015).
15. N. Nayerossadat, T. Maedeh, P.A. Ali, Viral and nonviral delivery systems for gene delivery, *Advanced Biomedical Research*, **1**, (2012).
16. X. Sun, N. Zhang, Cationic polymer optimization for efficient gene delivery, *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*, **10**, 108 (2010).
17. E. Junquera, E. Aicart, Cationic lipids as transfecting agents of DNA in gene therapy, *Current Topics in Medicinal Chemistry*, **14**, 649 (2014).
18. D. Zhi, Y. Bai, J. Yang, S. Cui, Y. Zhao, H. Chen, S. Zhang, A review on cationic lipids with different linkers for gene delivery, *Advances in Colloid and Interface Science*, **253**, 117 (2017).
19. S. Pushpendra, P. Arvind, B. Anil, Nucleic acids as therapeutics, en: "From Nucleic Acids Sequences to Molecular Medicine", Springer, 2012, pp. 19-45.
20. K. Sridharan, N.J. Gogtay, Therapeutic nucleic acids: current clinical status, *British Journal of Clinical Pharmacology*, **82**, 659 (2016).

21. N. Schultz, D.R. Marenstein, D.A. De Angelis, W.Q. Wang, S. Nelander, A. Jacobsen, D.S. Marks, J. Massagué, C. Sander, Off-target effects dominate a large-scale RNAi screen for modulators of the TGF- β pathway and reveal microRNA regulation of TGFBR2, *Silence*, **2**, 3 (2011).
22. W. Walther, S. Petkov, O. Kuvardina, J. Aumann, D. Kobelt, I. Fichtner, M. Lemm, J. Piontek, I. Blasig, U. Stein, Novel Clostridium perfringens enterotoxin suicide gene therapy for selective treatment of claudin-3-and-4-overexpressing tumors, *Gene Therapy*, **19**, 494 (2012).
23. A. Nakhilband, J. Barar, A. Bidmeshkipour, H.R. Heidari, Y. Omid, Bioimpacts of anti epidermal growth receptor antisense complexed with polyamidoamine dendrimers in human lung epithelial adenocarcinoma cells, *Journal of Biomedical Nanotechnology*, **6**, 360 (2010).
24. X.A. Chen, L.J. Zhang, Z.J. He, W.W. Wang, B. Xu, Q. Zhong, X.T. Shuai, L.Q. Yang, Y.B. Deng, Plasmid-encapsulated polyethylene glycol-grafted polyethylenimine nanoparticles for gene delivery into rat mesenchymal stem cells, *International Journal of Nanomedicine*, **6**, 843 (2011).
25. L. Senovilla, E. Vacchelli, P. Garcia, A. Eggermont, W.H. Fridman, J. Galon, L. Zitvogel, G. Kroemer, L. Galluzzi, Trial watch: DNA vaccines for cancer therapy, *Oncoimmunology*, **2**, e23803 (2013).
26. H. Yin, R.L. Kanasty, A.A. Eltoukhy, A.J. Vegas, J.R. Dorkin, D.G. Anderson, Non-viral vectors for gene-based therapy, *Nature Reviews Genetics*, **15**, 541 (2014).
27. G. Grandinetti, T.M. Reineke, Exploring the mechanism of plasmid DNA nuclear internalization with polymer-based vehicles, *Molecular Pharmaceutics*, **9**, 2256 (2012).
28. J. Kendrick, K. Matthews, J. Straughn Jr, M. Barnes, J. Fewell, K. Anwer, R. Alvarez, A phase I trial of intraperitoneal EGEN-001, a novel IL-12 gene therapeutic, administered alone or in combination with chemotherapy in patients with recurrent ovarian cancer, In: "ASCO Annual Meeting Proceedings", 2008 pp. 5572-5572.
29. P.L. Sinn, R.M. Anthony, P.B. McCray Jr, Genetic therapies for cystic fibrosis lung disease, *Human Molecular Genetics*, **20**, R79 (2011).

30. D.N. Nguyen, J.J. Green, J.M. Chan, R. Langer, D.G. Anderson, Polymeric materials for gene delivery and DNA vaccination, *Advanced Materials*, **21**, 847 (2009).
31. S. Dai, Natural cationic polymers for advanced gene and drug delivery, en: "Cationic Polymers in Regenerative Medicine", 2014, pp. 557-579.
32. J.H. Park, G. Saravanakumar, K. Kim, I.C. Kwon, Targeted delivery of low molecular drugs using chitosan and its derivatives, *Advanced Drug Delivery Reviews*, **62**, 28 (2010).
33. P. Zhang, E. Wagner, History of polymeric gene delivery systems, *Topics in Current Chemistry*, **375**, 26 (2017).
34. P. Vader, L.J. van der Aa, J.F. Engbersen, G. Storm, R.M. Schiffelers, Disulfide-based poly (amido amine) s for siRNA delivery: effects of structure on siRNA complexation, cellular uptake, gene silencing and toxicity, *Pharmaceutical Research*, **28**, 1013 (2011).
35. C.J. Bishop, T.M. Ketola, S.Y. Tzeng, J.C. Sunshine, A. Urtti, H. Lemmetyinen, E. Vuorimaa-Laukkanen, M. Yliperttula, J.J. Green, The Effect and Role of Carbon Atoms in Poly (β -amino ester)s for DNA Binding and Gene Delivery, *Journal of the American Chemical Society*, **135**, 6951 (2013).
36. Q.Y. Yu, Y.R. Zhan, J. Zhang, C.R. Luan, B. Wang, X.Q. Yu, Aromatic Modification of Low Molecular Weight PEI for Enhanced Gene Delivery, *Polymers*, **9**, 362 (2017).
37. J. Hu, W. Zhao, K. Liu, Q. Yu, Y. Mao, Z. Lu, Y. Zhang, M. Zhu, Low-molecular weight polyethylenimine modified with pluronic 123 and rgd-or chimeric rgd-nls peptide: Characteristics and transfection efficacy of their complexes with plasmid DNA, *Molecules*, **21**, 655 (2016).
38. G. Zhao, L. Long, L. Zhang, M. Peng, T. Cui, X. Wen, X. Zhou, L. Sun, L. Che, Smart pH-sensitive nanoassemblies with cleavable PEGylation for tumor targeted drug delivery, *Scientific Reports*, **7**, 3383 (2017).
39. T. Merdan, K. Kunath, H. Petersen, U. Bakowsky, K.H. Voigt, J. Kopecek, T. Kissel, PEGylation of poly (ethylene imine) affects stability of complexes with plasmid DNA under in vivo conditions in a dose-dependent manner after intravenous injection into mice, *Bioconjugate Chemistry*, **16**, 785 (2005).

40. S. Mao, M. Neu, O. Germershaus, O. Merkel, J. Sitterberg, U. Bakowsky, T. Kissel, Influence of polyethylene glycol chain length on the physicochemical and biological properties of poly (ethylene imine)-graft-poly (ethylene glycol) block copolymer/siRNA polyplexes, *Bioconjugate Chemistry*, **17**, 1209 (2006).
41. S. Ochrimenko, A. Vollrath, L. Tauhardt, K. Kempe, S. Schubert, U.S. Schubert, D. Fischer, Dextran-graft-linear poly (ethylene imine) s for gene delivery: importance of the linking strategy, *Carbohydrate Polymers*, **113**, 597 (2014).
42. S.H. Min, K.C. Park, Y.I. Yeom, Chitosan-mediated non-viral gene delivery with improved serum stability and reduced cytotoxicity, *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, **19**, 1077 (2014).
43. E. Malikmammadov, T.E. Tanir, A. Kiziltay, V. Hasirci, N. Hasirci, PCL and PCL-based materials in biomedical applications, *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, **29**, 863 (2018).
44. B.D. Ulery, L.S. Nair, C.T. Laurencin, Biomedical applications of biodegradable polymers, *Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics*, **49**, 832 (2011).
45. N. Cao, D. Cheng, S. Zou, H. Ai, J. Gao, X. Shuai, The synergistic effect of hierarchical assemblies of siRNA and chemotherapeutic drugs co-delivered into hepatic cancer cells, *Biomaterials*, **32**, 2222 (2011).
46. L.Y. Qiu, Y.H. Bae, Self-assembled polyethylenimine-graft-poly (ϵ -caprolactone) micelles as potential dual carriers of genes and anticancer drugs, *Biomaterials*, **28**, 4132 (2007).
47. T. Endres, M. Zheng, A.E. Kılıç, A. Turowska, M. Beck-Broichsitter, H. Renz, O.M. Merkel, T. Kissel, Amphiphilic biodegradable PEG-PCL-PEI triblock copolymers for FRET-capable in vitro and in vivo delivery of siRNA and quantum dots, *Molecular Pharmaceutics*, **11**, 1273 (2014).
48. M. Zheng, Y. Liu, O. Samsonova, T. Endres, O. Merkel, T. Kissel, Amphiphilic and biodegradable hy-PEI-g-PCL-b-PEG copolymers efficiently mediate transgene expression depending on their graft density, *International Journal of Pharmaceutics*, **427**, 80 (2012).
49. Y. Liu, O. Samsonova, B. Sproat, O. Merkel, T. Kissel, Biophysical characterization of hyper-branched polyethylenimine-graft-polycaprolactone-block-monomethoxyl-poly (ethylene glycol) copolymers (hy-PEI-PCL-mPEG) for siRNA delivery, *Journal of Controlled Release*, **153**, 262 (2011).

50. M. Zheng, D. Librizzi, A. Kılıç, Y. Liu, H. Renz, O.M. Merkel, T. Kissel, Enhancing in vivo circulation and siRNA delivery with biodegradable polyethylenimine-graft-polycaprolactone-block-poly (ethylene glycol) copolymers, *Biomaterials*, **33**, 6551 (2012).
51. Y. Wu, Y. Zhang, W. Zhang, C. Sun, J. Wu, J. Tang, Reversing of multidrug resistance breast cancer by co-delivery of P-gp siRNA and doxorubicin via folic acid-modified core-shell nanomicelles, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, **138**, 60 (2016).
52. O. Coulembier, S. Moins, S. Maji, Z. Zhang, B.G. de Geest, P. Dubois, R. Hoo-genboom, Linear polyethylenimine as (multi)functional initiator for organocatalytic l-lactide polymerization, *Journal of Materials Chemistry B*, **3**, 612 (2015).
53. V.M. Gaspar, P. Baril, E.C. Costa, D. de Melo-Diogo, F. Foucher, J.A. Queiroz, F. Sousa, C. Pichon, I.J. Correia, Bio-reducible poly (2-ethyl-2-oxazoline)-PLA-PEI-SS triblock copolymer micelles for co-delivery of DNA minicircles and Doxorubicin, *Journal of Controlled Release*, **213**, 175 (2015).
54. A. Mathew, H. Cao, E. Collin, W. Wang, A. Pandit, Hyperbranched PEGmethacrylate linear pDMAEMA block copolymer as an efficient non-viral gene delivery vector, *International Journal of Pharmaceutics*, **434**, 99 (2012).
55. F.J. Verbaan, P.K. Klouwenberg, J.H. van Steenis, C.J. Snel, O. Boerman, W.E. Hennink, G. Storm, Application of poly (2-(dimethylamino) ethyl methacrylate)-based polyplexes for gene transfer into human ovarian carcinoma cells, *International Journal of Pharmaceutics*, **304**, 185 (2005).
56. S. Agarwal, Y. Zhang, S. Maji, A. Greiner, PDMAEMA based gene delivery materials, *Materials Today*, **15**, 388 (2012).
57. C.V. Synatschke, A. Schallon, V.r. Jérôme, R. Freitag, A.H. Müller, Influence of polymer architecture and molecular weight of poly (2-(dimethylamino) ethyl methacrylate) polycations on transfection efficiency and cell viability in gene delivery, *Biomacromolecules*, **12**, 4247 (2011).
58. Y. Qiao, Y. Huang, C. Qiu, X. Yue, L. Deng, Y. Wan, J. Xing, C. Zhang, S. Yuan, A. Dong, The use of PEGylated poly 2-(N, N-dimethylamino) ethyl methacrylate. as a mucosal DNA delivery vector and the activation of innate immunity and improvement of HIV-1-specific immune responses, *Biomaterials*, **31**, 115 (2010).

59. X. Jiang, M.C. Lok, W.E. Hennink, Degradable-brushed pHEMA–pDMAEMA synthesized via ATRP and click chemistry for gene delivery, *Bioconjugate Chemistry*, **18**, 2077 (2007).
60. Y. Song, T. Zhang, X. Song, L. Zhang, C. Zhang, J. Xing, X.-J. Liang, Polycations with excellent gene transfection ability based on PVP-g-PDMAEMA with random coil and micelle structures as non-viral gene vectors, *Journal of Materials Chemistry B*, **3**, 911 (2015).
61. F. Xu, Y. Ping, J. Ma, G. Tang, W. Yang, J. Li, E. Kang, K. Neoh, Comb-shaped copolymers composed of hydroxypropyl cellulose backbones and cationic poly ((2-dimethyl amino) ethyl methacrylate) side chains for gene delivery, *Bioconjugate Chemistry*, **20**, 1449 (2009).
62. S. Guo, Y. Qiao, W. Wang, H. He, L. Deng, J. Xing, J. Xu, X.-J. Liang, A. Dong, Poly (ϵ -caprolactone)-graft-poly (2-(N, N-dimethylamino) ethyl methacrylate) nanoparticles: pH dependent thermo-sensitive multifunctional carriers for gene and drug delivery, *Journal of Materials Chemistry*, **20**, 6935 (2010).
63. Y. Huang, D. Lin, Q. Jiang, W. Zhang, S. Guo, P. Xiao, S. Zheng, X. Wang, H. Chen, H.Y. Zhang, Binary and ternary complexes based on polycaprolactone-graft-poly (N, N-dimethylaminoethyl methacrylate) for targeted siRNA delivery, *Biomaterials*, **33**, 4653 (2012).
64. C. Zhu, S. Jung, S. Luo, F. Meng, X. Zhu, T.G. Park, Z. Zhong, Co-delivery of siRNA and paclitaxel into cancer cells by biodegradable cationic micelles based on PDMAEMA-PCL-PDMAEMA triblock copolymers, *Biomaterials*, **31**, 2408 (2010).
65. X. Yue, Y. Qiao, N. Qiao, S. Guo, J. Xing, L. Deng, J. Xu, A. Dong, Amphiphilic Methoxy Poly (ethylene glycol)-b-poly (ϵ -caprolactone)-b-poly (2-dimethylaminoethyl methacrylate) Cationic Copolymer Nanoparticles as a Vector for Gene and Drug Delivery, *Biomacromolecules*, **11**, 2306 (2010).
66. X. Qian, L. Long, Z. Shi, C. Liu, M. Qiu, J. Sheng, P. Pu, X. Yuan, Y. Ren, C. Kang, Star-branched amphiphilic PLA-b-PDMAEMA copolymers for co-delivery of miR-21 inhibitor and doxorubicin to treat glioma, *Biomaterials*, **35**, 2322 (2014).

CÓMO CITAR ESTE ARTÍCULO

I.L. Díaz-Ariza, C.A. Sierra, L.D. Pérez-Pérez, Desarrollo de vectores génicos basados en polímeros sintéticos: PEI y PDMAEMA, *Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm.*, **47**(3), 350-374 (2018).

Potenciales candidatos antimaláricos y antiplasmodiales de origen natural y sintético

Ana María Mesa-Vanegas

Universidad de Antioquia, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Instituto de Biología, Calle 67 # 53-108, A.A 1226, Medellín, Colombia.

* Correo electrónico: amaria.mesa@udea.edu.co.

Recibido para evaluación: 15 de diciembre de 2017

Aceptado para publicación: 1 de junio de 2018

RESUMEN

La malaria es la enfermedad parasitaria más grave y extendida que enfrenta la humanidad, debido a su prevalencia, virulencia y al desarrollo de cepas resistentes a los medicamentos de uso común como la cloroquina. La falta de nuevos medicamentos asequibles son los factores limitantes en la lucha contra la malaria, por lo que hay una necesidad continua de investigación para nuevas clases de agentes antimaláricos. Una generación de moléculas activas contra *Plasmodium* basadas en el mecanismo de biocrystalización del grupo hemo o en procesos metabólicos que ocurren en el parásito con los medicamentos de uso actual están siendo sintetizados y actualmente se encuentran en procesos de estudios *in vitro*, *in vivo* y estudios clínicos fase I y fase II. Esta revisión realiza una clasificación de los nuevos antimaláricos potenciales y sus modos de acción reportados en las últimas dos décadas con el fin de proporcionar una mirada al progreso significativo en el desarrollo de nuevos medicamentos antimaláricos.

Palabras clave: Malaria, *Plasmodium*, antimalárico, quimioterapia, resistencia.

SUMMARY

Potential antiplasmodial and antimalarial agents of natural and synthetic origin

Malaria is the most serious and widespread parasitic disease facing humanity, due to its prevalence, virulence and the development of strains resistant to commonly used drugs such as chloroquine. The lack of affordable new drugs are the limiting factors in the fight against malaria, so there is a continuing need for research for new classes of antimalarial agents. A generation of active molecules against *Plasmodium* based on the mechanism of biocrystallization of the heme group and / or on metabolic processes that occur in the parasite with the medicines of current use are being synthesized and are currently in processes of in vitro, in vivo and phase I and phase II clinical studies. This review makes a classification of the new potential antimalarial and their possible modes of action reported in the last two decades in order to provide a look at the most significant progress in the development of new antimalarial drugs.

Key words: Malaria, *Plasmodium*, antimalarial, chemotherapy, resistance.

INTRODUCCIÓN

La malaria es uno de los problemas de salud más graves en muchas partes del mundo, particularmente en África y América Latina porque son las regiones con más altos índices de mortalidad [1]. Esta enfermedad es causada por un parásito de género *Plasmodium*, transmitido a los seres humanos por la picadura del mosquito hembra del género *Anopheles*, que se reproduce en regiones que combinan calor, humedad y vegetación [2]. Datos recientes, estiman que la malaria está presente en 97 países y se calcula que 3200 millones de personas están en riesgo de contraer la enfermedad [3]. En el 2015 se reportaron 214 millones de casos de malaria, ocasionando la muerte de 438.000 personas, en su mayoría niños menores de 5 años; África reportó la mayoría de los casos [4]. Una de las alternativas para el control de la morbimortalidad por malaria es la quimioterapia, sin embargo, se están presentando cepas de *Plasmodium* resistentes a los principales tratamientos, falla terapéutica, además de un escaso acceso a los medicamentos, entre otros, lo anterior aumenta el riesgo, y a la vez complica su prevención y tratamiento [5].

Actualmente, hay descubrimientos de nuevos blancos moleculares para el diagnóstico, prevención y tratamiento de enfermedades como la malaria, también mediante el secuenciamiento del genoma y el proteoma de *Plasmodium*, lo que ha permitido

postular nuevos modelos para el diseño de fármacos, además del desarrollo de la química combinatoria y el uso de la síntesis total de pequeñas moléculas; las cuales deben pasar por un proceso inicial de evaluación *in vitro* mediante técnicas que determinan la concentración a la cual se inhibe en un 50% el crecimiento del parásito (IC_{50}) [6-7]. Una generación de moléculas activas contra *Plasmodium falciparum* basadas en los mecanismos de acción de los medicamentos de uso actual como la cloroquina o en procesos metabólicos que ocurren en el patógeno están siendo sintetizadas, sin embargo, aunque se han descubierto y diseñado muchas moléculas con un potencial capaz de inhibir el crecimiento del parásito en cultivo *in vitro* y en modelos murinos, algunos son descartados por efectos tóxicos, resistencia por parte del patógeno, poca solubilidad y biodisponibilidad [8-11], por lo cual, aún se debe continuar en la búsqueda de nuevos antimaláricos efectivos y de bajo costo que permitan su uso combinado con otros medicamentos y así evitar el desarrollo de la resistencia del patógeno a los diferentes fármacos [12].

En la presente revisión se muestran las estrategias de diseño y desarrollo de nuevos fármacos obtenidos de plantas y de origen sintético basados en los blancos terapéuticos más estudiados, las cuales fueron consultadas en varias bases de datos (Science Direct, PUBMED, SciELO consultadas en agosto de 2017), libros especializados y demás reportes bibliográficos relacionados con estudios de actividad antiplasmodial y anti-malárica de compuestos activos sobre *Plasmodium*, lo que ha llevado a la identificación de una serie de posibles nuevos compuestos antimaláricos.

Moléculas basadas en el núcleo quinolínico

La quimioterapia ha sido posible gracias al descubrimiento de compuestos a partir de las plantas. Un alcaloide que ha jugado un papel importante y esencial en la medicina por cientos de años es la quinina, su química ha fascinado a muchos investigadores y ha motivado cambios en la química orgánica, síntesis enantioselectiva y en la química industrial moderna. La quinina se convirtió en un compuesto líder para el tratamiento de la malaria y ha sido empleado como modelo para realizar nuevos agentes antimaláricos por vía sintética con el núcleo quinolínico, como lo son: cloroquina (CQ), amodiaquina (AQ), mefloquina (MQ) y primaquina (PQ) [13].

Una nueva clase de análogos de la cloroquina con cadena lateral modificada están siendo sintetizados, Krogstad *et al.* en 1998 [14] sintetizaron una molécula denominada AQ-13 similar a la CQ con la diferencia del grupo metil en el carbono C-10. Esta molécula presentó una potente actividad con valores de concentración inhibitoria (IC_{50}) entre 5-15 nM, sobre el cultivo *in vitro* de *P. falciparum* y un mecanismo de inhibición de la polimerización del grupo hemo, sin embargo, se halló resistencia similar a la CQ, estudios clínicos fase I exhiben farmacocinéticas y toxicidades levemente diferentes a la CQ [15]. La amodiaquina es un fármaco efectivo, pero, en dosis superiores presenta efectos hepatotóxicos causando agranulocitosis, por lo que actualmente se están presentando desarrollos en el diseño y síntesis de moléculas basadas en

las 4-aminoquinolinas [16]. Un análogo similar a la amodiaquina fue diseñado bajo la comprensión del mecanismo de toxicidad de este fármaco. O'Neill *et al.* [17] realizaron estudios regioisoméricos de la amodiaquina e intercambiaron las posiciones de los grupos hidroxilo y el grupo amino, generando una nueva molécula llamada isoquina y otra N-t-butil-isoquina que son bastante activas y no generan hepatotoxicidad. Basados en las estructuras de la AQ y PQ se han derivado análogos estructurales conservando el grupo halogenuro en la posición C-7 del anillo, la cadena alquílica y la amina terciaria, todos estos derivados han presentado inhibición sobre el patógeno con similar modo de acción a la AQ y PQ.

La tafenoquina es otro compuesto que se encuentra en etapas avanzadas de desarrollo clínico, presenta un índice terapéutico más extenso que la primaquina y una eliminación mucho más lenta, pero su función terapéutica aún no se ha establecido [18]. Al mismo tiempo, el desarrollo de 2-terc-butilprimaquina ha proporcionado la primera 8-aminoquinolina completamente libre de toxicidad de metahemoglobina y actualmente se encuentra en desarrollo preclínico. De todos los análogos de la primaquina, las 4-alkil-5-alcoxi, 4-metil-5-fenoxi y 2-terc-butil-primaquina presentan una actividad curativa, toxicidad reducida y con una mayor promesa terapéutica (ver figura 1) [19].

Por otro lado, es estudiada una serie de complejos de rutenio-p-areno-cloroquina $[RuCl_2(CQ)]_2$ activos frente a cepas de *P. falciparum* resistentes a CQ con actividad antiplasmodial; este tipo de moléculas se evalúan en cuanto a su lipofilia, basicidad, coeficientes de reparto, valores de pKa, habilidad de inhibir la formación del grupo hemo en interfaces agua/n-octanol con la finalidad de predecir la superior acción antiplasmodial contra patógenos resistentes, los resultados indican tendencias interesantes como que la actividad antiplasmodial está relacionada con un equilibrio de los efectos asociados con la lipofilia, basicidad, y los detalles estructurales de los compuestos estudiados [20].

En lo que respecta a la basicidad de los antimaláricos, en diversos estudios se ha determinado que la halofantrina y sus derivados presentan un “efecto básico débil”; por lo que este tipo de principios activos tienen propiedades básicas, y se concentran en la vacuola digestiva ácida, y al tener una forma protonada no pueden atravesar nuevamente la membrana, generando toxicidad para el patógeno, pero también cardiotoxicidad en pacientes tratados. Un derivado de la halofantrina (el N-desbutilhalofantrina) es conocido como un metabolito activo de este medicamento, en el que se pudo eliminar el efecto secundario de cardiotoxicidad, sin alterar su actividad antimalárica, siendo la N-desbutilhalofantrina mucho más activa *in vitro* que la lumefantrina [21]. Otro ejemplo es la dihidroacridindiona WR243251 (derivado de la floxacrina), el cual fue desarrollado a partir del compuesto líder mepacrina [22], poco se conoce de este compuesto, en estudios *in vivo* presentó una actividad significativa contra cepas de *P. falciparum* resistentes a CQ en monos *Aotus*, además de que inhibió el desarrollo de esporozoítos de *P. vivax* en mosquitos; también se ha demostrado que este principio

activo inhibe la biocrystalización del grupo hemo, pero esto solo no representa claramente el mecanismo de su actividad, dado que se ha evidenciado que inhibe la respiración celular del patógeno. Estas moléculas son promisorias para ser candidatas antimaláricas y actualmente están en estudios de modelos *in vivo*. Sin embargo, el futuro potencial de esta clase de compuestos puede cuestionarse por su aparente resistencia cruzada con la CQ, lo que limita la continuidad en los estudios clínicos fase I (ver figura 2) [23].

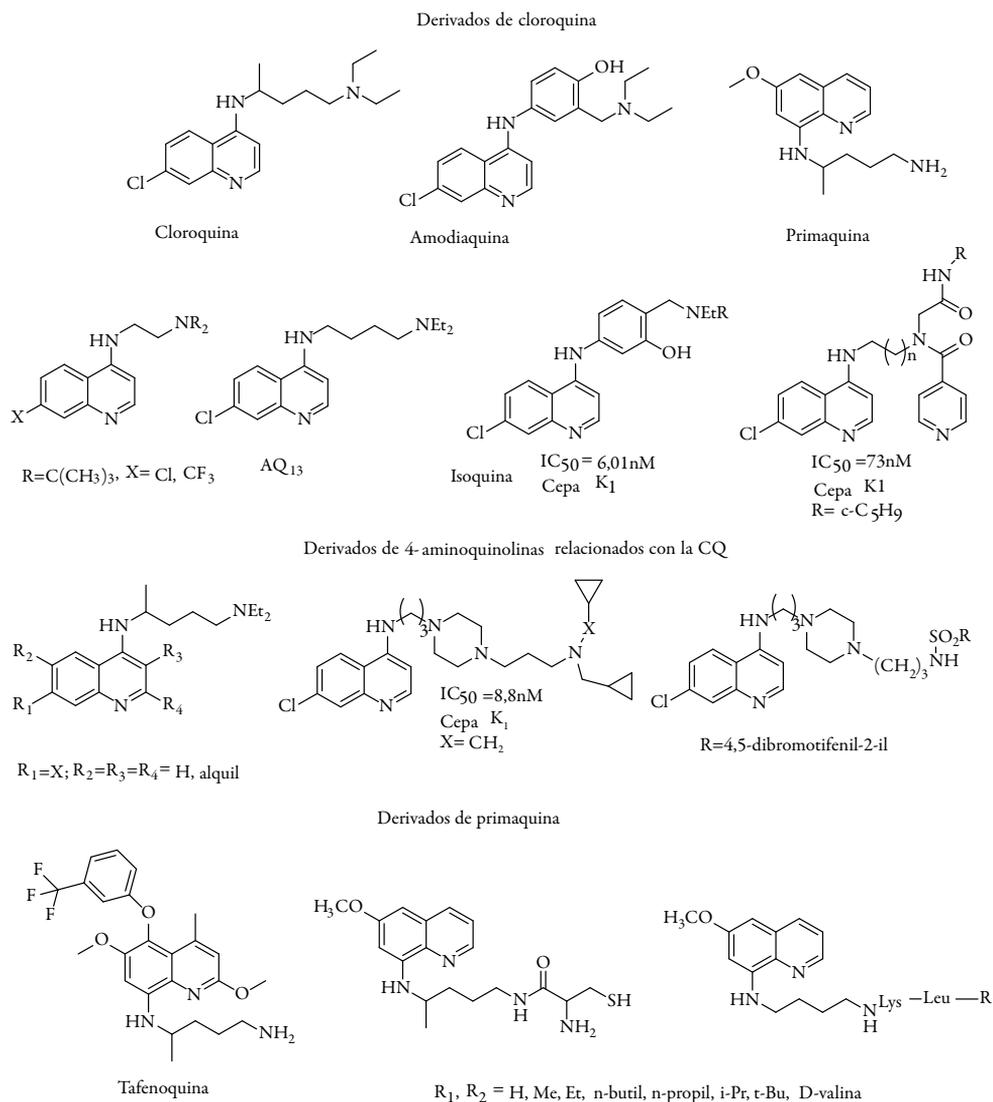


Figura 1. Derivados de cloroquina, amodiaquina y primaquina.

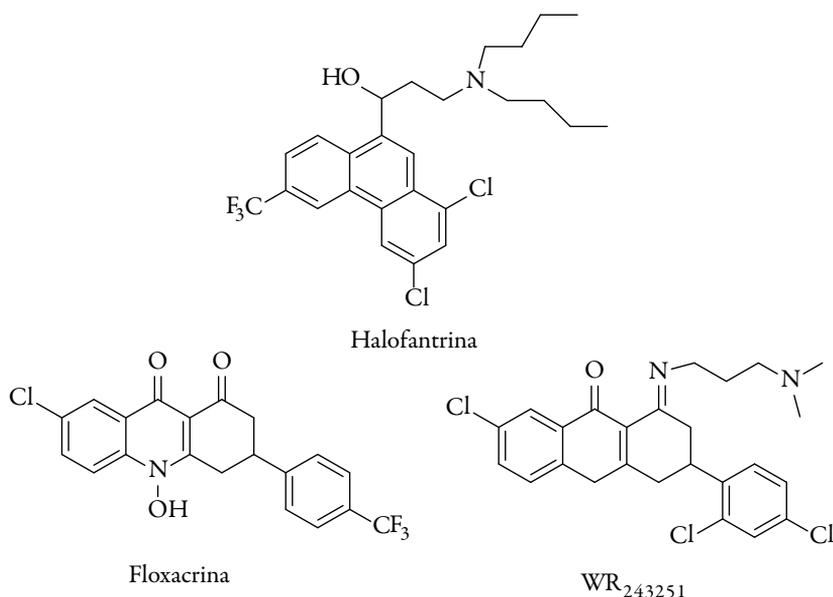


Figura 2. Inhibidores del grupo hemo.

Compuestos tipo trioxanos

El descubrimiento y desarrollo de la artemisinina a partir de la planta *Artemisia annua* (Asteraceae), una hierba china conocida popularmente en este país como Qing hao y empleada por la medicina tradicional por más de 2000 años para el tratamiento de fiebres es nueva clase de antimaláricos, tiene la estructura de una sesquiterpenolactona tipo trioxano con un puente endoperóxido, así se le confiere su actividad biológica, aunque es poco soluble en agua. Debido a la naturaleza altamente lipofílica y pobre solubilidad, la artemisinina presenta la desventaja de una pobre vida media en plasma, por lo que es muy probable que no se consiga eliminar el patógeno de forma completa en el organismo, de ahí la necesidad de tratamientos prolongados con este fármaco [13-24]. Por la estructura con un peróxido cíclico tipo trioxano se han sintetizado derivados basados en este modelo con rápida acción, más potentes, económicos y sin presentar casos clínicos de resistencia comparados con otros fármacos antimaláricos. Estos son compuestos prometedores, pero tienen una vida media corta por hidrolizarse rápidamente generando sustancias tóxicas [25-26]. Específicamente, el compuesto OZ277, que actualmente es la molécula líder como antimalárico con un mecanismo de acción similar al de las artemisininas, presenta ventajas como su fácil y económico proceso de síntesis, mejor biodisponibilidad y un reporte de eficacia *in vivo* del 99,9% de actividad a 30 mg/kg (oral) [27-28].

Otros estudios han tratado, aprovechando las ventajas farmacológicas, de combinar a partir de las denominadas trioxaquininas de los peróxidos con las 4-aminoquinolinas; los residuos 4-aminoquinolínicos deberían facilitar el transporte a la vacuola alimenticia, donde el FeII-Hemo liberado durante la digestión de la hemoglobina activa la unidad trioxano. La trioxaquinolina más activa sintetizada hasta el momento es la DU-1102, una molécula altamente eficiente contra cepas de *P. falciparum* resistentes a la CQ, posiblemente, como consecuencia de su modo de acción inespecífico; además algunos de los peróxidos mencionados exhiben actividades farmacológicas adicionales [29]. Se han sintetizado también dímeros de artemisinina como unidad central. El compuesto dimérico (ver figura 2) exhibe un valor de concentración efectiva de $CE_{50} = 1,3$ nM contra *P. falciparum in vitro*, mientras que artemisinina presenta un $CE_{50} = 9,7$ nM, en las mismas condiciones [30]. La simplificación del núcleo de artemisinina lleva a 3-ariltrioxanos sintéticos.

En una aplicación oral a un modelo murino, el compuesto fue dos veces más activo que la artemisinina en 48 horas. Basándose en la hipótesis de que el mecanismo de acción de las artemisininas depende de la generación de radicales libres por ruptura del puente endoperóxido, puede asumirse que otros peróxidos no relacionados estructuralmente con artemisinina, también pueden exhibir actividad antiplasmodial [31]. Otro tipo de modelos diméricos se basa en una serie de híbridos de artemisininas-vinil sulfonas con actividad potencial y capacidad de inhibición de la falcipaina 2, actúan sobre la vacuola digestiva mediante una activación del puente endoperóxido, estas son sintetizadas y evaluadas sobre cepas resistentes W2 de *Plasmodium falciparum* en un rango de concentración nanomolar (ver figura 3) [32].

Moléculas catiónicas y quelantes de hierro

Otro tipo de compuestos activos son las moléculas catiónicas, con el nombre de G25 y T3; sales de 2-aminopiridinium, amidinas y guanidinas, han obtenido inhibiciones de crecimiento en 50% de parásitos con dosis muy inferiores ($IC_{50}=0,65$ nM) a las empleadas normalmente con los medicamentos ya mencionados; estos actúan en el metabolismo de fosfolípidos inhibiendo la producción de colina que es indispensable en la síntesis y el desarrollo del patógeno, sin embargo, presentan una muy baja biodisponibilidad, dado que se degradan fácilmente en los fluidos corporales [33-34].

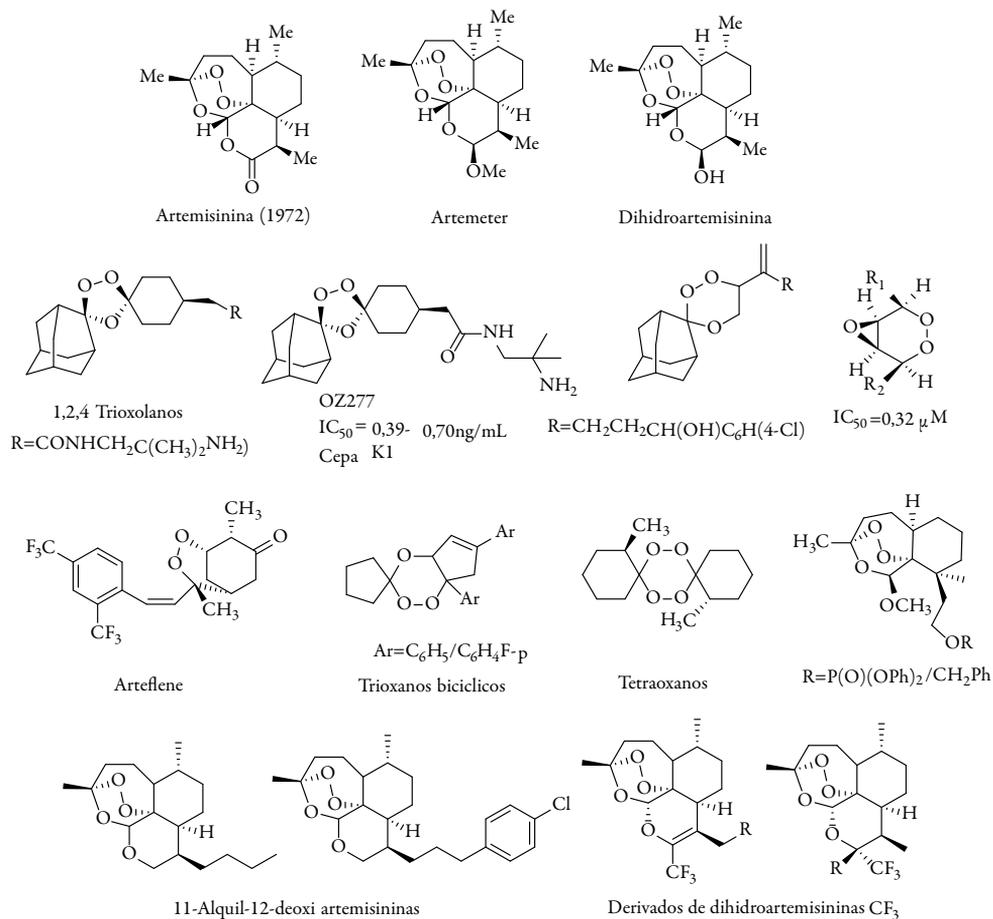


Figura 3. Derivados de artemisininas, trioxanos y peróxidos.

Estas moléculas se han ensayado en monos infectados con malaria los cuales se curan y son menos tóxicos; el G25 por otro lado, también ha mostrado su efectividad en ratones infectados con *Plasmodium berghei* que habían desarrollado resistencia a los antimaláricos, tanto en pruebas de laboratorio como en animales. Es por esto que nuevas moléculas amido bicíclicas y ésteres de ácidos dialquilamino fueron sintetizados y apenas están siendo investigadas como antimaláricos, actualmente, se hacen estudios de relaciones estructura-actividad donde se discutieron con más de 200 derivados [35]. En particular, los compuestos de tipo éster mostraron buena actividad antiplasmodial, uno de ellos se puso a prueba *in vivo* contra *P. berghei* con resultados prometedores, aunque el objetivo y el mecanismo de acción de estos compuestos aún se desconoce. Además, se ha logrado una clara mejora en sus propiedades antiplasmodiales [36].

Varios 4-aminobiciclos [2.2.2] octilfitalato ω -ésteres de ácidos dialquilamino se han diseñado, y tienen actividad contra la polifarmacorresistente cepa K1 del *P. falciparum* y *Trypanosoma brucei rhodesiense* (STIB 900). La actividad biológica fue influenciada por la relación de la configuración en la posición 2 del anillo, por la longitud de la cadena y la sustitución de aminoácidos. Los ésteres fueron tan activos como la cloroquina, sin embargo, uno de ellos exhibe la más alta actividad y selectividad antiplasmodial de todos los derivados del biciclo-octano preparados y hasta ahora reportados (ver figura 4) [37].

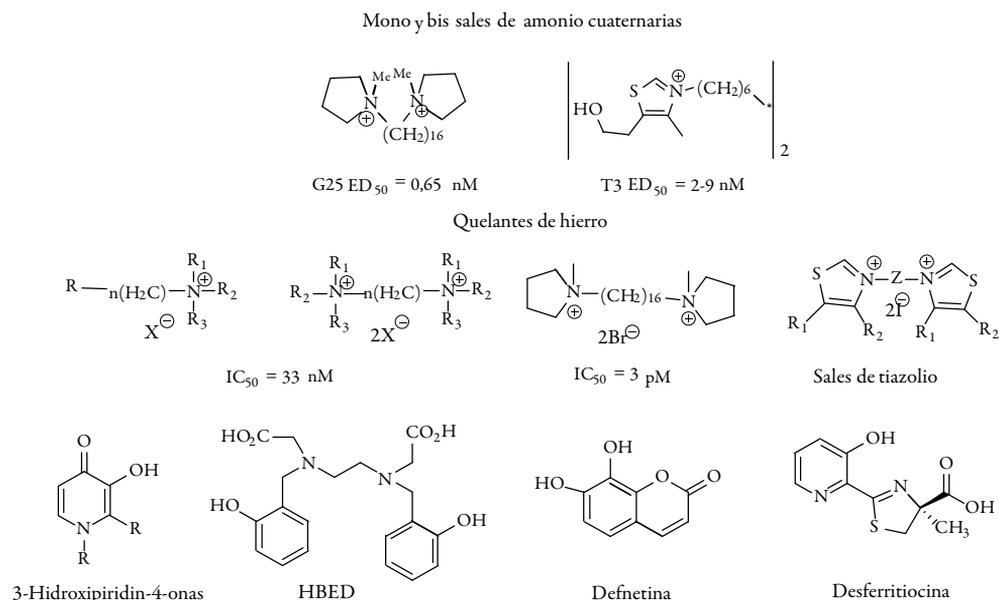


Figura 4. Sales de amonio cuaternarias y quelantes de hierro.

Inhibidores de proteasas y moléculas peptídicas

Otras moléculas exploradas con actividad antiprotozoaria son DB-75 y DB-289 (2,5-bis(4-amidinofenil) furanos) las cuales son agentes tripanocidas, químicamente son diamidinas aromáticas que originalmente se desarrollaron como estructuras análogas de la pentamidina que es antitripanosomal, estos compuestos presentaron actividad contra *P. falciparum*. Otro caso es el compuesto PB-93 empleado como agente antitumoral, este inhibe la proteína farnesiltransferasa y el cual se ha determinado que es clave para la supervivencia de *P. falciparum* [38-41]. La farnesiltransferasa es una proteína heterodimérica que cataliza la transferencia de un residuo farnesil desde farnesilpirofosfato hacia una cisteína de una cadena lateral cercana al extremo carboxi-terminal de algunas proteínas. En los últimos años se desarrollaron inhibidores de farnesiltransferasa como potenciales fármacos en terapias anticáncer y como posibles

antimaláricos (ver figura 4) [42-43]. Por otra parte, la síntesis y evaluación biológica de una nueva clase de inhibidores de Falcipain-2 (FP-2) peptidomiméticos I que son una familia papaína-(C1A) cisteína proteasa, juegan un papel importante en el ciclo de vida del patógeno por ser degradantes de las proteínas del eritrocito y que contienen fracciones de esteres vinílicos con alto potencial ($R_1 = \text{Ven}$, CONMe_2 , CO_2Me para $R = \text{CH}_2\text{CH}_2\text{Ph}$, H ; $R_1 = \text{NC}$, $R = \text{H}$).

El perfil de reactividad de vinilo éster I ($R = \text{H}$, $R_1 = \text{CO}_2\text{Me}$) demostró ser muy potente y selectivo inhibidor de falcipain-2 [44-45]. Otros compuestos como los ciclodepsipéptidos mostraron una interesante gama de actividad biológica. Los miembros de esta nueva clase de potenciales fármacos tienen una característica común de ciclodepsipéptidos, además, se basan en las interacciones con distintos compartimentos celulares y vías de transducción de señales. Algunos ciclodepsipéptidos están siendo evaluados en estudios clínicos y, actualmente, se utilizan en la terapia del cáncer, generalmente en combinación con otros fármacos citotóxicos [46].

Una serie de derivados de la neocriptoleptina como los cloro-amino-alquilamino-sustituidos (5-metil-5H-indolo [2,3-b] quinolina) fueron sintetizados y evaluados como agentes antiplasmodiales. Esta evaluación también incluyó la citotoxicidad en células MRC5; la inhibición de la formación de la β -hematina, y las interacciones de ADN y la introducción de cadenas amino-alquilamino aumento sustancialmente la actividad antiplasmodial de la neocriptoleptina. Las formas más eficientes de estos compuestos mostraron actividades antiplasmodiales en el rango nanomolar. La degradación de la hemoglobina en la vacuola alimenticia del patógeno se cataliza en forma dirigida por una serie de proteasas, las cuales están parcialmente caracterizadas y disponibles como proteínas recombinantes. La ruptura inicial de la hemoglobina está mediada por las proteasas aspárticas plasmepsina I, II y IV. Nuevos inhibidores de proteasas están siendo diseñados, como el N1, N1-dietil-N4-(5-metil-5H-indolo [2,3-b] Hidroxi-8-il) pentano-1,4-diamina (I) el cual mostró una IC_{50} de 0,01 mM y un índice de selectividad de 1800 (ver figura 5) [47].

Inhibidores de la síntesis de ácidos grasos

En los parásitos de *Plasmodium* ha sido demostrada la existencia de un sistema de biosíntesis de los ácidos grasos tipo II. En este caso, las enzimas individuales están localizadas en el interior del apicoplasto y son similares a las involucradas en la síntesis de isoprenoides. El antibiótico natural tiolactomicina inhibe las enzimas Fab B, Fab F y Fab H, las cuales catalizan las distintas etapas de condensación en la síntesis de ácidos grasos en *P. falciparum*. El compuesto es activo *in vivo* contra el crecimiento de *P. falciparum* ($\text{CE}_{50} = 50 \mu\text{M}$). A su vez, el triclosan es significativamente más activo que la tiolactomicina frente a *P. falciparum*; este es un inhibidor de la trans-2-enoil-ACP-reductasa, Fab I ($\text{CE}_{50} = 1 \mu\text{M}$). Además, se demostró su eficacia < 90% en ratones

infectados con *P. berghei*. Los correspondientes valores de CE_{50} y LD_{90} , tras inyecciones subcutáneas, fueron 3 y 30 mg/kg respectivamente (ver figura 6). Se testaron varios derivados de triclosán en cuanto a su actividad antimalárica, sin embargo, como presenta actividad frente a un amplio espectro de bacterias, se utiliza como conservante en varios productos de uso doméstico, pero no se aconseja su uso para el tratamiento por vía oral [48].

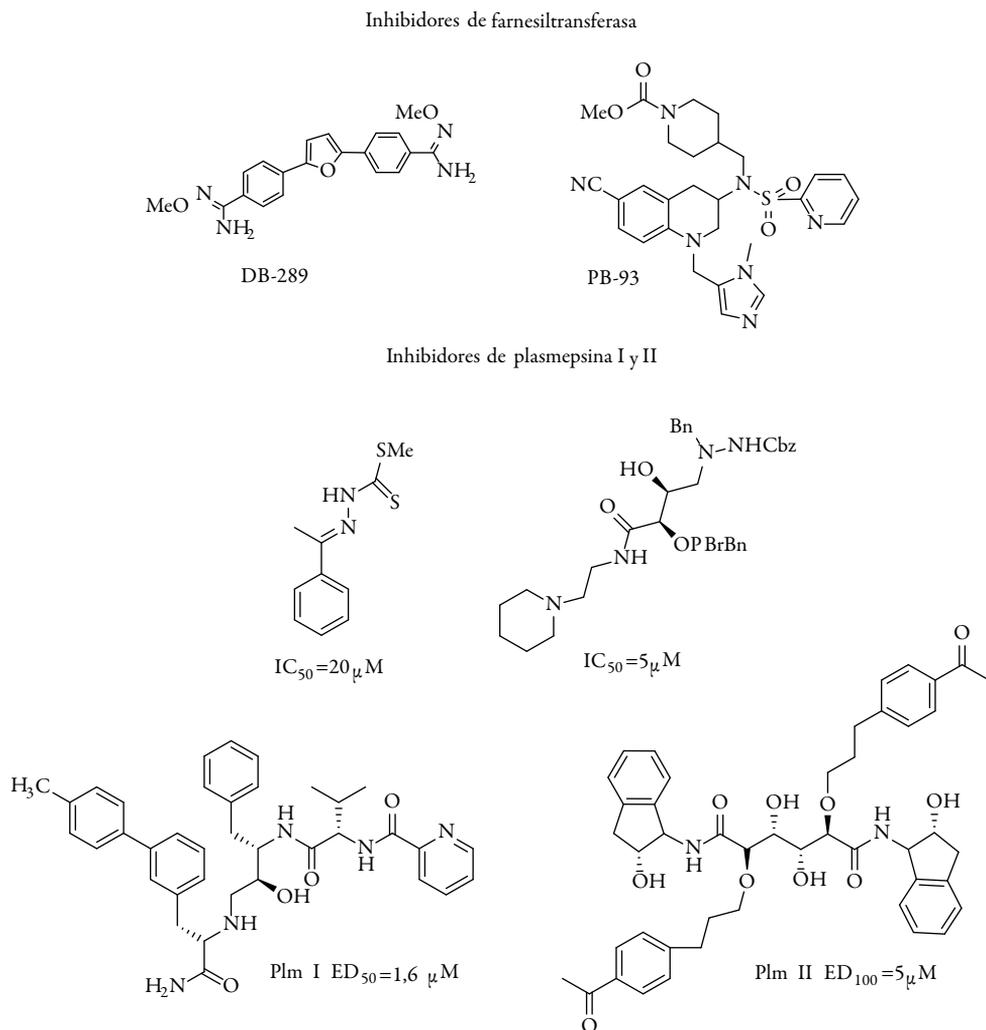


Figura 5. Inhibidores de plasmepsina y farnesiltransferasa DB-289, PB-93, PlmI y PlmII.

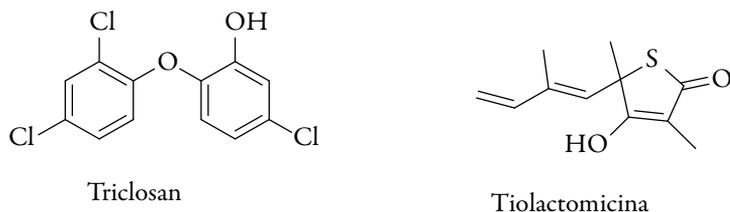


Figura 6. Inhibidores de la síntesis de ácidos grasos.

Inhibidores de la glicólisis

El ciclo funcional del ácido cítrico está ausente en los parásitos de la malaria, por lo tanto, su energía metabólica depende mayoritariamente de la glicólisis anaerobia. El NAD⁺ debe ser regenerado por reducción de piruvato a lactato. La enzima lactato deshidrogenasa de *P. falciparum* ha sido producida como una proteína recombinante, y se ha hecho un análisis cristalográfico de alta resolución de ella. Se está utilizando una combinación de métodos de evaluación biológica de alto rendimiento y diferentes técnicas de diseño racional con el fin de identificar inhibidores específicos que no afecten esta enzima en humanos (ver figura 7) [49-50].

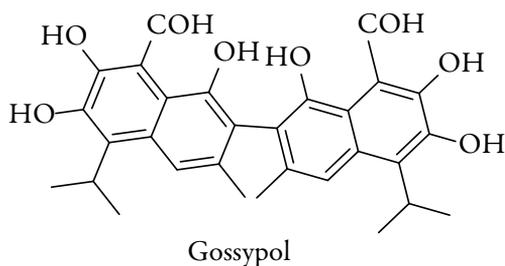


Figura 7. Polifenoles inhibidores de glicólisis.

Sin embargo, a pesar de ser un blanco específico en el patógeno y que todas estas nuevas moléculas han presentado una capacidad de inhibir el crecimiento del parásito en cultivo *in vitro*, varias de ellas son descartadas por sus efectos tóxicos, resistencia del parásito, pobre solubilidad y biodisponibilidad, por lo que aún se debe continuar la búsqueda de nuevos antimaláricos que permitan su uso combinado con otros medicamentos para así evitar el desarrollo de la resistencia del patógeno [51].

Moléculas híbridas

Una tendencia que está tomando fuerza en la actualidad en el diseño de nuevos agentes antimaláricos son las moléculas híbridas, las cuales están basadas estructuralmente en la unión de farmacóforos con procedimientos sintéticos de bajo costo y bajo potencial para el desarrollo de la resistencia [52]. Actualmente las moléculas híbridas son

consideradas como un nicho en el diseño racional de fármacos; dichas moléculas se definen como entidades químicas con dos (o más) dominios estructurales que presentan diferentes funciones biológicas (estructura química también es una denominación, pero se prefiere el término de híbridos), en la cual la doble actividad indica que una molécula híbrida actúa como dos farmacóforos distintos [53]. Ambas entidades de la molécula híbrida no necesariamente actúan sobre el mismo blanco biológico. La estrategia de una molécula híbrida mejora la actividad biológica en un fragmento de la molécula, lo cual se da mediante la adición de funciones químicas capaces de interactuar con las regiones adyacentes de la molécula activa cuando la proteína destino se desconoce. El fragmento de auto-ensamblaje consiste en permitir que dos o tres fragmentos con funcionalidades diferentes o semejantes puedan reaccionar en el sitio de destino para generar *in situ* enlaces covalentes con distintos blancos.

En esta dirección se ha diseñado mediante metodologías de síntesis una nueva molécula híbrida entre dos potentes antimaláricos, la artemisinina y la quinina (artemisinina-quinina). Resultados con esta molécula híbrida mostraron una mejor actividad ($IC_{50}=8,95$ nM) en comparación con las moléculas individuales de artemisinina ($IC_{50}=49,4$ nM), quinina ($IC_{50}=149$ nM) e incluso con la combinación 1:1 de artemisinina y quinina ($IC_{50}=31,8$ nM) cuando fueron evaluadas en cepas 3D7 de *P. falciparum* sensibles a CQ [54]. Por otra parte, Cowman *et al.* han diseñado moléculas híbridas denominadas bisquinolinas, en las cuales dos núcleos quinolínicos están conectados por varios enlaces, siendo mucho más activas y con mecanismos de acción similar a la CQ, pero fueron tóxicas en estudios *in vivo*, por lo que actualmente son el motivo de varios trabajos de investigación [55-56]. También se han sintetizado modelos híbridos de trioxaquinas con un trioxano como estructura base (que es responsable de la actividad antimalárica de la artemisinina), ambos unidos a una entidad aminoquinolina (que es responsable de la propiedad antiplasmodial de la cloroquina). Estas trioxaquinas híbridas son muy potentes y exhiben actividad eficaz contra los fases eritrocíticas de cepas de *P. falciparum* resistentes a CQ [57]. Musonda *et al.* [58-60] han diseñado híbridos a partir de dos medicamentos conocidos contra la malaria, la cloroquina (CQ) y el astemizol, encontrándose que poseen mejor actividad *in vitro* e *in vivo* contra cepas de *Plasmodium* resistentes a CQ.

Sunduru *et al.* [61] han funcionalizado las 4-aminoquinolinas con oxalamidas y triazinas en la cadena lateral, y fueron evaluados y seleccionados por sus actividades contra la malaria. En un ensayo *in vitro*, uno de los derivados de la triazina resultó ser el más activo contra la cepa 3D7 de *Plasmodium falciparum* sensible a CQ, presentándose un valor de IC_{50} de 5,23 ng/mL; mientras que, un derivado de la oxalamida presentó *in vivo* supresión de la parasitemia del 70,45 % en el día 4 contra la cepa N-67 de *Plasmodium yoelii* resistente a CQ, demostrando que la estructura-actividad está relacionada con una función amida secundaria que aumenta la actividad, mientras que la presencia de una amida terciaria y un α -cetoamida disminuye la actividad debido a que también disminuye la capacidad de los sitios de unión con el sitio activo. Por otro lado, derivados

de triazina, sustituidos con aminas que tienen nitrógeno terminal de base como la clo-roquina, aumentan potencialmente la actividad antiplasmodial.

Recientemente, se ha desarrollado una innovadora clase de nuevos híbridos basados en productos naturales. Hans *et al.* [62] sintetizaron 36 nuevas moléculas híbridas a partir de productos naturales basados en β -amino alcoholes, tiolactona-chalconas y isatin-chalconas; donde las moléculas híbridas tiolactona-chalconas mostraron valores de IC_{50} en un rango de 0,68 a 6,08 μ M, encontrándose la mayor actividad frente a la cepa W2 de *P. falciparum*; mientras que con las de isatin-chalconas se encontró una IC_{50} de 14,9 μ M o menos. En otro estudio se sintetizaron 34 derivados de lupeol, demostrando actividad contra la malaria en una dosis más baja (10 μ g/mL) que la del lupeol puro (25 μ g/mL) [51]. Este número limitado de ejemplos con moléculas híbridas citadas está tomando fuerza en la investigación, por lo que son muchas otras nuevas entidades que se han reportado, por ejemplo, híbridos de artemisinina-acridina, trioxaferroqui-nas, cloroquina-astemizole [63] triazinas 9-anilinoacridina, arteminin-dipetidil vinil sulfonas [64], aminoquinolinas híbridas [65] entre otras; en su mayoría, estas mejoran el efecto antiplasmodial e ilustran el concepto de moléculas híbridas y sus potenciales aplicaciones (ver figura 8).

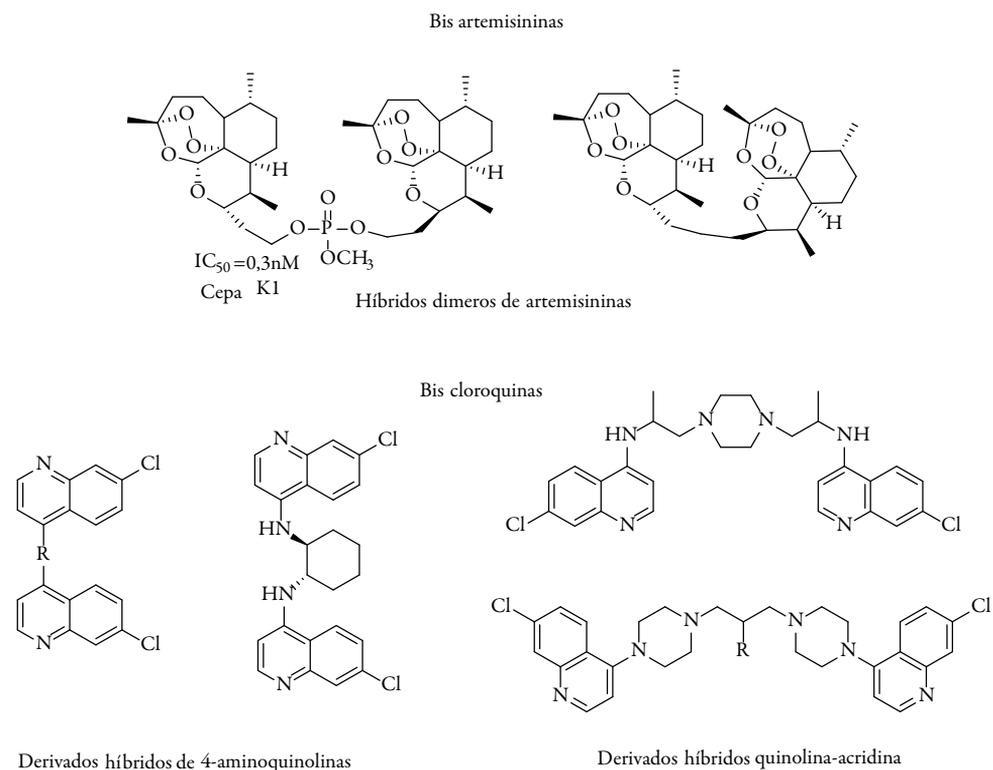


Figura 8. Moléculas híbridas de artemisinina y cloroquina.

Derivados indólicos

La criptolepina componente presente en gran cantidad en la especie *Cryptolepis sanguinolenta*, y en un estudio presentó un IC_{50} de $0,134 \mu M$ sobre cepa K1 de *P. falciparum*, esto es dos veces más potente que la cloroquina (IC_{50} de $0,230 \mu M$), sin embargo, presenta un alto grado de citotoxicidad por su capacidad de intercalarse en el ADN. Otro compuesto en este grupo es el 3-metilen-sustituido (ver figura 9), el cual es usado en la evaluación de indolinonas como inhibidores de la falcipaina, una enzima usada por el parásito para digestión de hemoglobina. Estos compuestos reaccionan fácilmente con tioles a través de un mecanismo de adición-eliminación, lo que indica su potencial como inhibidores de enzimas como la cisteín-proteasa (falcipaina). Varias indolinonas que contienen un fragmento de reconocimiento Leu-i-amilo son inhibidoras moderadas del *P. falciparum* y de la proteína cisteín-proteasa falcipaina-2, pero no de la proteasa relacionada falcipaina-3, estos compuestos muestran la actividad antiplasmodial contra la cepa W2 de *P. falciparum* resistente a la cloroquina en el rango micromolar [66].

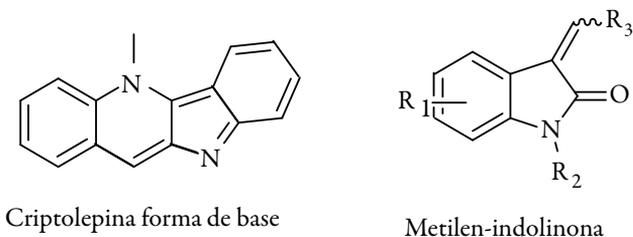


Figura 9. Derivados indólicos.

Derivados de productos naturales

Existe gran variedad de metabolitos secundarios que son químicamente diversos, los cuales pueden ser obtenidos a partir de plantas específicas reportadas por la medicina tradicional, o a nivel de género o familia botánica, y muchos compuestos de este tipo han sido validados como antimaláricos promisorios, puesto que en bioensayos hay actividad antiplasmodial significativa frente a diferentes cepas del patógeno; algunos compuestos se muestran en la figura 10 [67]. El yingzhaosu A, un peróxido aislado de la planta *Artabotrys uncinatus*, L. (Annonaceae), y su derivado sintético artefleno, también son activos, sin embargo, su pobre eficacia clínica y la dificultad de su síntesis, hacen difícil la continuación de su desarrollo [68].

Entre los productos naturales con potencial actividad antiplasmodial, los alcaloides indólicos representan un grupo de compuestos de interesantes farmacológico; los indoles son compuestos orgánicos heterocíclicos, con estructura bicíclica que consisten

en un anillo de seis miembros (benceno) unido a otro de cinco miembros (pirrol), donde participa un par aislado de electrones de nitrógeno en anillo aromático, por lo que refiere a que el indol no es una base y no representa una amina simple. Uno de los alcaloides más conocidos es la quinina, cuyo núcleo quinolínico se forma por la vía biosintética común de alcaloides indolomonoterpénicos (la clase más importante de indol alcaloides).

Uno de los alcaloides que ha mostrado interés en su descubrimiento es el alcaloide indoloquinolínico criptolepina, el cual es el componente con mayor proporción aislado de las raíces y hojas de *Cryptolepis sanguinolenta*, una planta comúnmente usada por la medicina tradicional en el oeste de África para el tratamiento de la malaria y otras enfermedades. Esta molécula mostró ser activa en cepas K1 y T996 de *P. falciparum* resistentes y sensibles a la cloroquina. Este alcaloide con características débilmente básicas es activo, mientras que otros alcaloides estructuralmente relacionados con perfiles de ácido-base son inactivos. En modelo *in vivo* en ratones infectados con *P. berghei yoelii* mostraron una significativa reducción de la parasitemia cuando se administra oralmente a dosis de 50 mg/kg de peso por cuatro días. Sin embargo, como resultado de su capacidad de intercalarse en el ADN, la inhibición de replicación y transcripción del ADN, la criptolepina es tóxica [69].

La síntesis de la criptolepina es bastante viable y gran variedad de análogos sintéticos han sido reportados; entre los diferentes derivados sintéticos obtenidos a partir de la criptolepina, la 2,7-dibromocriptolepina es la más activa, presentando una actividad aproximadamente 10 veces mayor que la criptolepina con una inhibición del 89 % en una sola dosis de 12 mg/kg/día por vía intraperitoneal y una citotoxicidad apenas un poco mayor contra células cancerígenas, y baja toxicidad en ratones (ver figura 10) [70].

CONCLUSIONES

A pesar de los grandes esfuerzos por controlar la enfermedad de la malaria, aún no existen vacunas o medicamentos capaces de prevenirla, solo existen tratamientos curativos que presentan inconvenientes como: la eficacia, la toxicidad variable y la resistencia del parásito a ellos, lo que hace que el control de la enfermedad se convierta en uno de los principales desafíos para la salud pública. En las últimas dos décadas, nuevos candidatos antimaláricos han sido desarrollados, pero en el descubrimiento de nuevos fármacos para contribuir al tratamiento de distintas enfermedades (entre estas la malaria), se debe tener en cuenta que estos sean: potentes, selectivos, seguros, no presenten resistencia, tolerables, no tóxicos, aplicables por diferentes vías, estables en líquidos biológicos y que se puedan obtener a gran escala industrial. El proceso de investigación y desarrollo

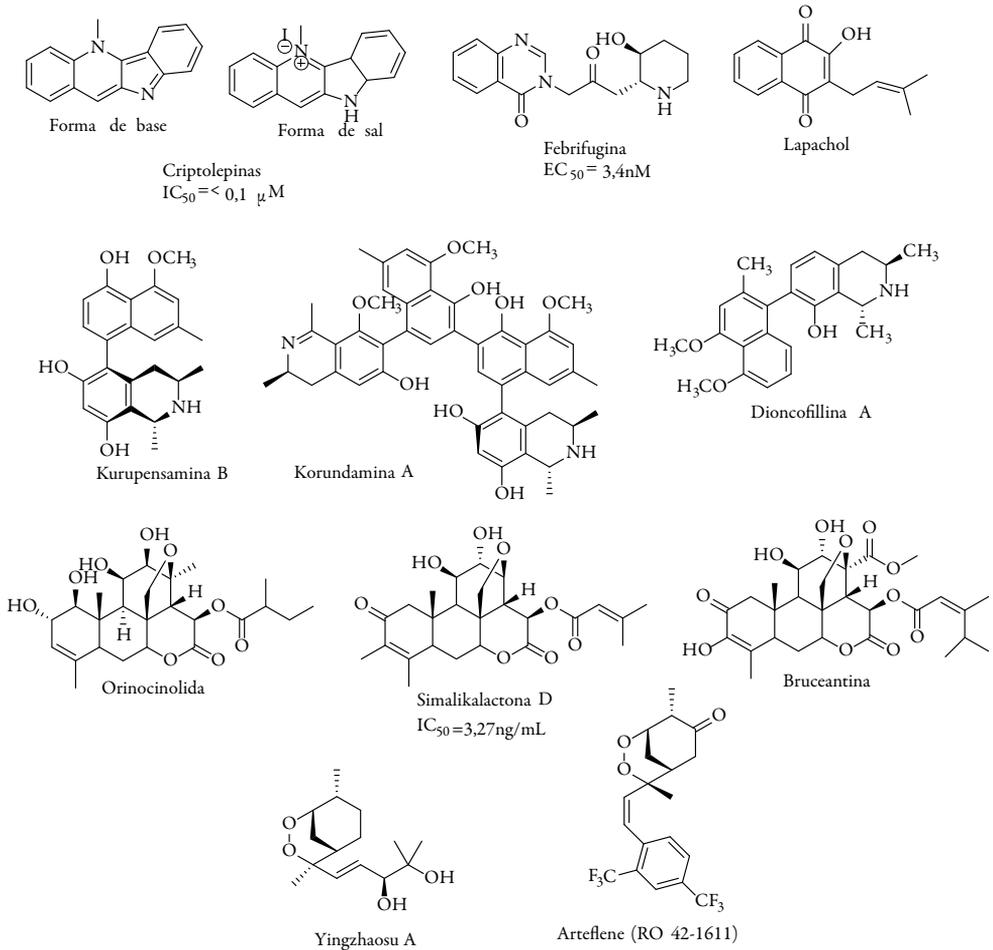


Figura 10. Derivados de productos de productos naturales.

de un fármaco es largo y complejo, involucra grandes costos y pocas posibilidades de éxito, debido principalmente a los efectos tóxicos y a los parámetros farmacocinéticos los cuales están sujetos a una gran variabilidad interindividual.

En los últimos años se han realizado considerables esfuerzos en diseñar moléculas revirtiendo la resistencia a los medicamentos, nuevas clases estructurales de agentes antimaláricos con núcleo quinolínico, trioxanos, quelantes de hierro, sales de amonio cuaternario, inhibidores de proteasas, glicólisis y ácidos grasos, nuevos híbridos, péptidos, indoles y derivados de productos naturales.

La investigación realizada sobre las quinolinas y las artemisininas proporcionó información importante con respecto a la relación estructura-actividad de esta clase de compuestos, además, existe una tendencia creciente hacia el desarrollo de antimaláricos con blancos específicos, por ejemplo, agentes inhibidores del grupo hemo, de la farnesiltransferasa, inhibidores de lactato deshidrogenasa, o la formación de híbridos antimaláricos. De las muchas moléculas identificadas y ensayadas aún no se presenta una nueva generación de candidatos antimaláricos dado que están siendo descartados en las distintas etapas del proceso, por lo que es urgente continuar la búsqueda de nuevos antimaláricos efectivos y de bajo costo que permitan su uso combinado con otros medicamentos y así evitar el desarrollo de la resistencia del parásito a los diferentes fármacos.

La complejidad de estos procesos es manejada por una diversidad de disciplinas científicas que incluye químicos orgánicos, biólogos moleculares, toxicólogos, médicos, farmacólogos, bioquímicos y científicos de la computación que participan en alguna etapa del proceso, lo que en parte explica los enormes costos involucrados. Finalmente, es necesaria la investigación en el desarrollo de nuevos antimaláricos para los próximos años porque la carga de la malaria seguirá siendo alta en las próximas décadas junto con la pérdida repetida de antimaláricos para la resistencia.

CONFLICTO DE INTERESES

Los autores no declaran conflicto de intereses.

REFERENCIAS

1. A. Robert, O. Dechy-Cabaret, J. Cazelles, F. Benoit-Vical y B. Meunier B., Recent Advances in Malaria Chemotherapy, *J. Chinese Chem. Soc.*, **49**, 301-310, (2002).
2. P. Olumese, "Guidelines for the treatment of malaria", World Health Organization, 2006.
3. OMS, "Informe mundial sobre el paludismo 2014", Ginebra, Organización Mundial de la Salud, 2014. URL: http://www.who.int/malaria/publications/world_malaria_report_2014/en
4. OMS, "Estrategia Técnica Mundial contra la Malaria 2016-2030", Organización Mundial de la Salud, 2016. URL: <http://www.who.int/malaria/publications/atoz/9789241564991/es/>

5. C. Sánchez, Una mirada a las enfermedades parasitarias en el país, *NOVA Publicación Científica*, **4**, 5(2006).
6. N. Arora, A.K. Banerjee, New Targets, New Hope: Novel Drug Targets for Curbing Malaria. *Mini Rev. Med. Chem.*, **12**(3), 210-226 (2012).
7. M.J. Meyers, The Medicinal Chemistry of Novel Approaches for the Treatment of Malaria, *Curr. Top. Med. Chem.*, **12**(5), 371 (2012).
8. C.W. Jefford, Synthetic Peroxides as Potent Antimalarials. News and Views, *Curr. Top. Med. Chem.*, **12**(5), 373-399 (2012).
9. M. Delves, D. Plouffe, C. Scheurer, S. Meister, S. Wittlin, E. Winzeler, *et al.*, The Activities of Current Antimalarial Drugs on the Life Cycle Stages of *Plasmodium*: A Comparative Study with Human and Rodent Parasites, *PLoS Medicine*, **9**(2), 1-14 (2012).
10. T.T. Diagana, Supporting malaria elimination with 21st century antimalarial agent drug discovery, *Drug Discovery Today*, **20**(10), 1265-1270 (2015).
11. S. Vangapandu, M. Jain, K. Kaur, P. Patil, S. Patel, R. Jain, Recent Advances in Antimalarial Drug Development, *Med. Res. Rev.*, **27**(1), 65-107 (2007).
12. M.L. Go, Novel antiplasmodial agents, *Med. Res. Rev.*, **23**(4), 456-487 (2003).
13. A.M. Mesa, Historical perspective of antimalarials of natural origin, *Anal. R. Acad. Nac. Farm.*, **83**(2), 167-174 (2017).
14. De, D., Krogstad, F. M., Byers, L. D., & Krogstad, D. J., Structure activity relationships for antiplasmodial activity among 7-substituted 4-aminoquinolines, *J. Med. Chem.*, **41**(25), 4918-4926 (1998).
15. F. Mzayek, H. Deng, F.J. Mather, W.C. Wasilevich, H. Liu, C.M. Hadi, *et al.*, Randomized dose-ranging controlled trial of AQ-13, a candidate antimalarial and chloroquine in healthy volunteers, *PLoS Clinical Trials*, **2**(1), e6 (2007).
16. P.B. Madrid, N.T. Wilson, J.L. De Risi, R.K. Guy, Parallel synthesis and anti-malarial screening of a 4-aminoquinoline library, *J. Comb. Chem.*, **6**, 437-442 (2004).
17. P.M. O'Neill, A. Mukhtar, P.A. Stocks, L.E. Randle, S. Hindley, S.A. Ward, *et al.*, Isoquine and related amodiaquine analogues: a new generation of improved 4-aminoquinoline antimalarials, *J. Med. Chem.*, **46**, 4933-4945 (2003).

18. J. Watson, W.R.J Taylor, G. Bancone, C. Chu, P. Jittamala, N.J. White, Implications of current therapeutic restrictions for primaquine and tafenoquine in the radical cure of vivax malaria, *PLoS Negl. Trop. Dis.*, **12**(4):e0006440 (2018).
19. N.T. Huy, K. Mizunuma, K Kaur, N.T. Nhien, M. Jain, D.T. Uyen, *et al.*, 2-Tert-butyl-8-quinolinamines exhibit potent blood schizontocidal antimalarial activity via inhibition of heme crystallization, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **51**(8), 2842-2847 (2007).
20. A. Martinez, C.S. Rajapakse, D. Jalloh, C. Dautriche, R.A. Sanchez-Delgado, The antimalarial activity of Ru-chloroquine complexes against resistant *Plasmodium falciparum* is related to lipophilicity, basicity, and heme aggregation inhibition ability near water/n-octanol interfaces, *J. Biol. Inorg. Chem.*, **14**(6), 863-871 (2009).
21. D.R. Brocks, Stereoselective halofantrine and desbutylhalofantrine disposition in the rat: cardiac and plasma concentrations and plasma protein binding, *Biopharm. Drug Dispos.*, **23**(1), 9-15 (2002).
22. E.L. Suswam, D. Kyle, N. Lang-Unnasch, *Plasmodium falciparum*: the effects of atovaquone resistance on respiration, *Exp. Parasitol.*, **98**(4), 180-187 (2001).
23. J. Berman, L. Brown, R. Miller, S.L. Andersen, P. McGreevy, B.G. Schuster, W. Ellis, A. Ager, R. Rossan, Antimalarial activity of WR 243251, a dihydroacridinedione, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **38**, 1753-1756 (1994).
24. C.X. Liu, Discovery and Development of Artemisinin and Related Compounds, *Chinese Herb. Med.*, **9**(2), 101-114 (2017).
25. G.H. Posner, P.M. O'Neill, Knowledge of the proposed chemical mechanism of action and cytochrome p450 metabolism of antimalarial trioxanes like artemisinin allows rational design of new antimalarial peroxides, *Acc. Chem. Res.*, **37**, 397-404 (2004).
26. U. Eckstein-Ludwig, R.J. Webb, I.D. Van-Goethem, J.M. East, A.G. Lee, M. Kimura, *et al.*, Artemisinins target the SERCA of *Plasmodium falciparum*, *Nature*, **424**, 957-961 (2003).
27. J.L. Vennerstrom, S. Arbe-Barnes, R. Brun, S.A. Charman, F.C. Chiu, J. Chollet, *et al.*, Identification of an antimalarial synthetic trioxolane drug development candidate, *Nature*, **430**, 900-904 (2004).

28. I.H. Paik, S. Xie, T.A. Shapiro, T. Labonte, S.A.A. Narducci, A.C. Baege, *et al.*, Second generation, orally active, antimalarial, artemisinin-derived trioxane dimers with high stability, efficacy, and anticancer activity, *J. Med. Chem.*, **49**(9), 2731-2734 (2006).
29. L.K. Basco, O. Dechy-Cabaret, M. Ndounga, F.S. Meche, A. Robert, B. Meunier, *In vitro* activities of DU-1102, a new trioxaquine derivative, against *Plasmodium falciparum* isolates, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **45**(6), 1886-1888 (2001).
30. T. Fröhlich, F. Hahn, L. Belmudes, M. Leidenberger, O. Friedrich, B. Kappes, *et al.*, Synthesis of artemisinin-derived di/tri-mers and dendrimers, investigation of their activity against *P. falciparum* and cytomegalovirus, and insights into their mechanisms of action, *Chemistry, A Eur. J.*, **24**(32), doi 10.1002/chem.201800729.
31. C. Singh, R. Kanchan, D. Srivastava, S.K. Puri, 8-(1-Naphthalen-2-yl-vinyl)-6,7,10-trioxaspiro (4.5) decane, a new 1,2,4-trioxane effective against rodent and simian malaria, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **16**(3), 584-586 (2005).
32. R. Capela, R. Oliveira, L.M. Goncalves, A. Domingos, J. Gut, P.J. Rosenthal, *et al.*, Artemisinin-dipeptidyl vinyl sulfone hybrid molecules: Design, synthesis and preliminary SAR for antiplasmodial activity and falcipain-2 inhibition, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **19**(12), 3229-3232 (2009).
33. M. Calas, M.L. Ancelin, G. Cordina, P. Portefaix, G. Piquet, V. Vidal-Sailhan, *et al.*, Antimalarial activity of compounds interfering with *Plasmodium falciparum* phospholipid metabolism: comparison between mono- and bisquaternary ammonium salts, *J. Med. Chem.*, **43**(3), 505-516 (2000).
34. H.J. Vial, S. Wein, C. Farenc, C. Kocken, O. Nicolas, M.L. Ancelin, *et al.*, Prodrugs of bithiazolium salts are orally potent antimalarials, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **101**(43), 15458-15463 (2004).
35. J. Faist, W. Seebacher, C. Schlapper, M. Kaiser, R. Brun, R. Saf, *et al.*, Antiplasmodial and antitrypanosomal activity of bicyclic amides and esters of dialkylamino acids, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **17**(10), 3595-3603 (2009).
36. R. Weis, W. Seebacher, New bicyclic amines: synthesis and SARs of their action against the causative organisms of malaria and sleeping sickness, *Curr. Med. Chem.*, **16**(11), 1426-1441 (2009).

37. C. Schlapper, W. Seebacher, J. Faist, M. Kaiser, R. Brun, R. Saf, *et al.*, Antiplasmodial and antitrypanosomal activities of aminobicyclo[2.2.2]octyl w -aminoalkanoates, *Eur. J. Pharm. Sci.*, **44**(2), 736-744 (2009).
38. L. Nallan, B.K. Bauer, P. Bendale, K. Rivas, K. Yokoyama, C.P. Horney, *et al.*, Protein farnesyltransferase inhibitors exhibit potent antimalarial activity, *J. Med. Chem.*, **48**(11), 3704-3713 (2005).
39. M.Z. Wang, J.Y. Saulter, E. Usuki, Y.L. Cheung, M. Hall, A.S. Bridges, *et al.*, CYP4F enzymes are the major enzymes in human liver microsomes that catalyze the O-demethylation of the antiparasitic prodrug DB289 [2,5-bis(4-amidinophenyl)furan-bis-O-methylamidoxime], *Drug Metab. Dispos.*, **34**(12), 1985-1994 (2006).
40. R.T. Eastman, J. White, O. Hucke, K. Bauer, K. Yokoyama, L. Nallan, *et al.*, Resistance to a protein farnesyltransferase inhibitor in *Plasmodium falciparum*, *J. Biol. Chem.*, **280**(14), 13554-13559 (2005).
41. A.M. Mathias, J.L. Holman, L.M. Sturk, M.A. Ismail, D.W. Boykin, R.R. Tidwell, *et al.*, Accumulation and intracellular distribution of antitrypanosomal diamidine compounds DB75 and DB820 in African trypanosomes, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **50**(6), 2185-2191 (2006).
42. P. Yeramian, S.R. Meshnick, S. Krudsood, K. Chalermrut, U. Silachamroon, N. Tangpukdee, *et al.*, Efficacy of DB289 in Thai patients with *Plasmodium vivax* or acute, uncomplicated *Plasmodium falciparum* infections, *J. Infect. Dis.*, **192**(2), 319-322 (2005).
43. R. Ettari, N. Micale, T. Schirmeister, C. Gelhaus, M. Leippe, E. Nizi, *et al.*, Novel Peptidomimetics Containing a Vinyl Ester Moiety as Highly Potent and Selective Falcipain-2 Inhibitors, *J. Med. Chem.*, **52**(7), 2157-2160 (2009).
44. K.R. Kuldeep, Targeting the active sites of malarial proteases for antimalarial drug discovery: approaches, progress and challenges, *Int. J. Antimicrob. Agents*, **50**, 287-302 (2017).
45. C. Wenhua, H. Zhenghui, W. Wanyan, M. Fei, G. Longfei, Y. Tang, *et al.*, Discovery of new antimalarial agents: Second-generation dual inhibitors against FP-2 and PfDHFR via fragments assembly, *Bioorg. Med. Chem.*, **25**(24), 6467-6478 (2017).

46. R. Lemmens-Gruber, M.R. Kamyar, R. Dornetshuber. Cyclodepsipeptides-potential drugs and lead compounds in the drug development process, *Curr. Med. Chem.*, **16**(9), 1122-1137 (2009).
47. I. El Sayed, P. Van der Veken, K. Steert, L. Dhooghe, S. Hostyn, G. Van Baelen, *et al.*, Synthesis and Antiplasmodial Activity of Aminoalkylamino-Substituted Neocryptolepine Derivatives, *J. Med. Chem.*, **52**(9), 2979-2988 (2009).
48. S. Mishra, K. Karmodiya, P. Parasuraman, A. Surolia, N. Surolia, Design, synthesis, and application of novel triclosan prodrugs as potential antimalarial and antibacterial agents, *Bioorg. Med. Chem.*, **16**(10), 5536-5546 (2008).
49. D.A. Van Schalkwyk, W. Priebe, K.J. Saliba, The inhibitory effect of 2-halo derivatives of D-glucose on glycolysis and on the proliferation of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*, *Pharmacol. Res. Perspect.*, **327**(2), 511-517 (2008).
50. M. Andreas, K. Conrad. Selective inhibitors of *Plasmodium falciparum* glycogen synthase-3 (PfGSK-3): New antimalarial agents?, *(BBA) Proteins and Proteomics*, **1854**(10), 1644-1649 (2015).
51. M.H. Gelb, Drug discovery for malaria: a very challenging and timely endeavor, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **11**, 440-445 (2007).
52. V.V. Kouznetsov, A. Gomez-Barrio, Recent developments in the design and synthesis of hybrid molecules based on aminoquinoline ring and their antiplasmodial evaluation, *Eur. J. Pharm. Sci.*, **44**(8), 3091-3113 (2009).
53. C.C. Musonda, G.A. Whitlock, M.J. Witty, R. Brun, M. Kaiser, Chloroquine-astemizole hybrids with potent in vitro and in vivo antiplasmodial activity, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **19**(2), 481-484 (2009).
54. J.J. Walsh, D. Coughlan, N. Heneghan, C. Gaynora, A. Bellb, A novel artemisinin-quinine hybrid with potent antimalarial activity, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **17**, 3599-3602 (2007).
55. V.V. Kouznetsov, A. Gomez-Barrio, Recent developments in the design and synthesis of hybrid molecules based on aminoquinoline ring and their antiplasmodial evaluation, *Eur. J. Pharm. Sci.*, **44**(8): 3091-3113 (2009).

56. N. Sunduru, M. Sharma, K. Srivastava, S. Rajakumar, S. Puri, J.K. Saxena, *et al.*, Synthesis of oxalamide and triazine derivatives as a novel class of hybrid 4-aminoquinoline with potent antiplasmodial activity, *Bioorg. Med. Chem.*, **17**(17), 6451-6462 (2009).
57. F. Benoit-Vical, A. Lelievre, C. Berry, O. Deymier, J. Dechy-Cabaret, J. Cazeilles, *et al.*, Trioxaquines are new antimalarial agents active on all erythrocytic forms, including gametocytes, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **51**(4), 1463-1472 (2007).
58. C.C. Musonda, G.A. Whitlock, M.J. Witty, R. Brun, M. Kaiser, Chloroquine-astemizole hybrids with potent *in vitro* and *in vivo* antiplasmodial activity, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **19**(2), 481-484 (2009).
59. F.W. Muregi, A. Ishih. Next-generation antimalarial drugs: hybrid molecules as a new strategy in drug design. *Drug Develop. Res.*, **71**(1), 20-32 (2010).
60. C. Musonda, G. Whitlock, M. Witty, R. Brun, M. Kaiser, Chloroquine-astemizole hybrids with potent *in vitro* and *in vivo* antiplasmodial activity, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **19**(2), 481-484 (2009).
61. N. Sunduru, M. Sharma, K. Srivastava, S. Rajakumar, S.K. Puri, J.K. Saxena, *et al.*, Synthesis of oxalamide and triazine derivatives as a novel class of hybrid 4-aminoquinoline with potent antiplasmodial activity, *Bioorg. Med. Chem.*, 2009, **17**(17): 6451-6462.
62. R.H. Hans, J. Gut, P.J. Rosenthal, K. Chibale, Comparison of the antiplasmodial and falcipain-2 inhibitory activity of β -amino alcohol thiolactonechalcone and isatin-chalcone hybrids, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **20**(7), 2234-2237 (2010).
63. S. Kumar, M. Namita, R. Kanwal, S. Kumkum, S. K. Purib, Novel class of hybrid natural products derived from lupeol as antimalarial. Agents, *Nat. Prod. Res.*, **22**(4), 305-319 (2008).
64. R. Capela, R. Oliveira, L. Goncalves, A. Domingos, J. Gut, P. Rosenthal, *et al.*, Artemisinin-dipeptidyl vinyl sulfone hybrid molecules: Design, synthesis and preliminary SAR for antiplasmodial activity and falcipain-2 inhibition, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **19**(12), 3229-3232 (2009).
65. I. El Sayed, P. Van der Veken, K. Steert, L. Dhooqhe, *et al.*, Synthesis and antiplasmodial activity of aminoalkylamino-substituted neocryptolepine derivatives, *J. Med. Chem.*, **52**(9), 2979-2988 (2009).

66. G.C. Kirby, A. Paine, D.C. Warhurst, B.K Noamese, J.D. Phillipson, *In vitro* and *in vivo* antimalarial activity of cryptolepine, a plant-derived indoloquinoline, *Phytother. Res.*, **9**(5), 359-363 (1995).
67. S. Saxena, N. Pant, D. Jain, R.S. Bhakuni, Antimalarial agents from plant sources, *Current Science*, **85**(9), 1314-1329 (2003).
68. M.T. Lemma, A.M. Ahmed, M.T. Elhady, H.T. Ngo, Medicinal plants for *in vitro* antiplasmodial activities: A systematic review of literature, *Patogenol. Int.*, **66**(6), 713-720 (2017).
69. G. Kirby, A. Paine, D.C. Warhurst, B.K Noamese, J.D Phillipson, *In vitro* and *in vivo* antimalarial activity of cryptolepine, a plant-derived indoloquinoline, *Phytother. Res.*, **9**(5), 359-363 (1995).
70. K. Vipani, M. Aman, C. Kelly, Synthetic medicinal chemistry of selected antimalarial natural products, *Bioorg. Med. Chem.*, **17**(6), 2236-2275 (2009).

CÓMO CITAR ESTE ARTÍCULO

A.M. Mesa-Vanegas, Potenciales candidatos antimaláricos y antiplasmodiales de origen natural y sintético, *Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm.*, **47**(3), 375-399 (2018).

Avaliação teórica do uso do oxihidróxido de vanádio trivalente na detecção eletroquímica de nandrolona

Volodymyr V. Tkach^{1,2*}, Yana G. Ivanushko¹, Svitlana M. Lukanova¹, Sílvio C. de Oliveira², Fauze J. Anaissi³, Nataliia M. Storoshchuk¹, Petro I. Yagodynets¹

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

* Correio eletrônico: nightwatcher2401@gmail.com.

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

³ Universidade Estadual do Centro-Oeste, Setor de Ciências Exatas e da Terra, Departamento de Química, Laboratório de Materiais e Compostos Inorgânicos, Rua Simeão Varela de Sá, 03, 85040-080, Guarapuava, PR, Brasil.

Recebido em: 24 de novembro de 2017

Aceito em: 13 de Agosto de 2018

RESUMO

Pela primeira vez foi descrito um caso interessante de uso do oxihidróxido de vanádio trivalente (VO(OH)) como modificador de eletrodo na detecção eletroquímica de nandrolona. Foi mostrado que o oxihidróxido de vanádio pode ser um modificador eficiente para a detecção de nandrolona, mas, ao contrário da maioria dos casos de uso de oxihidróxido de cobalto, composto parecido, o processo é catódico e dá-se em meio moderadamente ácido a neutro. O comportamento oscilatório, no sistema, é possível apenas por causa das influências do processo da eletrorredução de vanádio tetravalente em trivalente na dupla camada elétrica.

Palavras-chave: Eletrodos quimicamente modificados, nandrolona, oxihidróxido de vanádio (III), eletrorredução catódica, estado estacionário estável.

SUMMARY

The theoretical evaluation of the use of trivalent vanadium oxyhydroxide in the electrochemical determination of nandrolone

An interesting case of the use of trivalent vanadium oxyhydroxide (VO(OH)) as an electrode modifier for nandrolone electrochemical determination has been described for the first time. It was shown that vanadium (III) oxyhydroxide may be an efficient electrode modifier for nandrolone determination, but, contrarily to the majority of the cases of the use of cobalt (III) oxyhydroxide, which is a relative compound, the process is cathodic and it is realized in moderately acid solutions, tending to neutral. The oscillatory behavior in the system is possible, due to the influence of the electrochemical reduction of tetravalent vanadium to trivalent in double electric layer.

Key words: Chemically modified electrodes, nandrolone, vanadium (III) oxyhydroxide, cathodic electrochemical reduction, stable steady-state.

INTRODUÇÃO

Uma das infrações frequentes, cometidas pelos desportistas no mundo inteiro é a dita dopagem bioquímica [1-2], cujo desiderato é o fortalecimento desigual do organismo com vistas ao aumento de produtividade física. É proibida nas competições [3-5]. Além disso, em alguns países, como Austrália, Áustria, França e Itália, a dopagem bioquímica, usada pelos esportistas, é equiparada à fraude e, por conseguinte, punida legalmente [5].

Uma das substâncias, consideradas um dopante, é a nandrolona (Número CAS: 434-22-0; 7 β -[[[Sodiooxi]sulfonil]oxi]estr-4-en-3-ono;(17beta)-Hydroxyestr-4-en-3-ono-17-sulfato de sódio) (ver figura 1) [6-12], um androgênio sintético, existente sob várias formas. Por exemplo, o sulfato de sódio e de nandrolona, que, diga-se a verdade, pode ser considerado um semiéster ou um semissal, é um colírio, usado como fármaco de uso oftálmico na Espanha, na Dinamarca, na Suíça, na França, na Bélgica e em Portugal [6]. Em Portugal, ele é vendido como Nandrain^(®), na Espanha e na Bélgica, Nandrol^(®) e na Dinamarca, na Suíça e na França, Keratyl^(®) [8]. Nos Estados Unidos de América (EUA) também é usado e incluído na dita Pasta 3 [9].

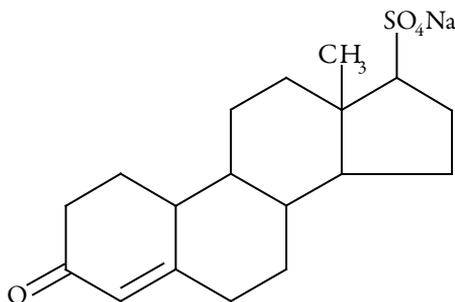


Figura 1. Sulfato de sódio e de nandrolona.

Além do uso como fármaco oftálmico, é, também, utilizado para o tratamento de anemias, carcinoma de pulmões, angioedemas hereditárias, deficiências de antitrombina III, excessos de fibrinogênio, falhas de crescimento e síndrome de Taylor. Também é indicado na prevenção de angioedemas hereditárias [9].

Os seus efeitos colaterais podem incluir as anomalias hepáticas como neoplasmas, hepatites holestáticas [10], náuseas, vômitos, diarreias, insônias, acne [11], efeito de estimulação e dopagem, razão por que não é recomendada aos desportistas, entre outros efeitos de vários cunhos. Destarte, o desenvolvimento dos métodos eficientes de determinação eletroquímica desta substância é, deveras, um problema atual [12], e os métodos eletroquímicos dar-lhe-iam um bom serviço.

Vários métodos eletroquímicos foram elaborados para a detecção eletroquímica da nandrolona, em que vários modificadores de elétrodos foram usados, como fulerenos, grafeno e polímeros condutores [13-15]. Outro modificador de elétrodo poderia ser o oxihidróxido de vanádio (VO(OH)), um composto com comportamento eletroquímico flexível, mas mais acentuado para as propriedades redutoras [16]. No entretanto, até ao momento da submissão do presente trabalho, nenhum trabalho experimental acerca da modificação do elétrodo por VO(OH) para fins eletroanalíticos tem sido publicado, e a introdução de um novo modificador de elétrodo pode acarretar os problemas como:

- Possível incompatibilidade do modificador com o meio da eletroanálise.
- Possibilidade da aparição das instabilidades eletroquímicas, características para o comportamento do composto semelhante que é o oxihidróxido de cobalto [17-18] durante o desempenho mediador de VO(OH).

Todos esses problemas podem ser resolvidos, sendo feita uma análise teórica do desempenho do oxihidróxido de vanádio, incluindo a elaboração e a análise de um modelo matemático, capaz de descrever adequadamente o desempenho do sistema. Outrossim, a modelagem permitir-nos-á comparar o desempenho deste sistema com o dos semelhantes, prevendo as divergências de comportamento sem ensaios experimentais.

Destarte, o desiderato do nosso trabalho é análise mecanística teórica do desempenho de oxihidróxido de vanádio na determinação eletroquímica da nandrolona. Para aproximar-nos a ele, alcançamos os objetivos específicos como:

- Sugerir um mecanismo de desempenho do oxihidróxido de vanádio na detecção eletroquímica da nandrolona.
- Desenvolver o modelo matemático, condizente com os processos, que levam à aparição do sinal analítico.
- A partir da análise do modelo, detectar as condições do melhor desempenho do sensor (estado estacionário estável) e das instabilidades, se as pode haver.
- Comparar o comportamento deste sistema com o dos semelhantes [19-21]

O SISTEMA E O SEU MODELO

O desempenho de $\text{VO}(\text{OH})$ como modificador de eléctrodo para a detecção da nandrolona dar-se-á como exposto na figura 2:

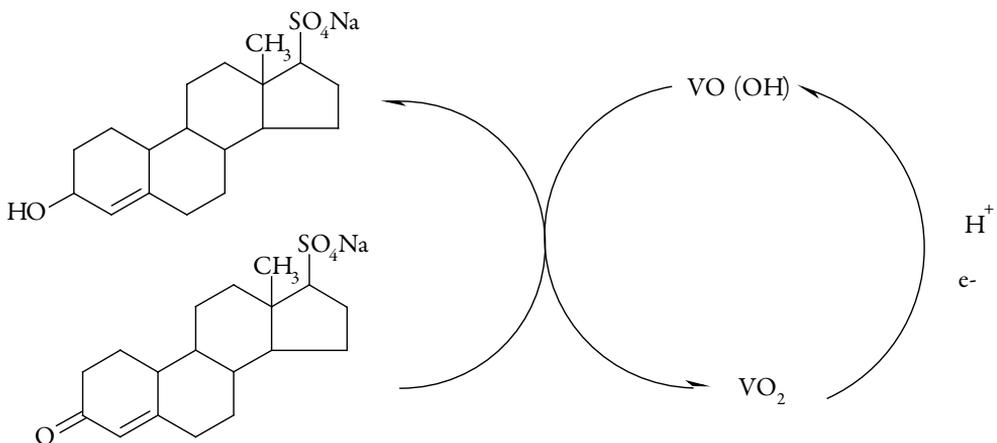


Figura 2 . O processo eletroanalítico, baseado no desempenho do oxihidróxido de vanádio.

A melhor eficácia de VO(OH) como modificador de eléctrodo pode ser alcançada em meios moderadamente ácido a neutro. O meio fortemente ácido pode dissolver o material, formando os íons V³⁺.



e o comportamento do VO(OH) em meios fortemente ácidos analisar-se-á nos nossos próximos trabalhos.

Destarte, a maior eficácia do oxihidróxido de vanádio como modificador de eléctrodo dar-se-á em meios menos ácidos. Como os prótons participam do sistema eletroanalítico, este se descreverá, no caso mais simples, pelas três variáveis:

n : a concentração da nandrolona na camada pré-superficial;

v : a concentração do dióxido de vanádio no cátodo;

h : a concentração dos prótons na camada pré-superficial.

Para simplificar a modelagem, supomos que o reator esteja agitando-se intensamente, de modo que possamos menosprezar o fluxo de convecção, que o eletrólito de suporte esteja em excesso, para menosprezar o fluxo de migração. Também supomos que a camada pré-superficial esteja de espessura constante, igual a δ , e que o perfil concentracional dos dois analitos seja linear.

É possível mostrar que, supondo o supracitado, o sistema se descreve mediante um conjunto de equações diferenciais (2):

$$\left\{ \begin{array}{l} \frac{dn}{dt} = \frac{2}{\delta} \left(\frac{\Delta}{\delta} (n_0 - n) - r_1 \right) \\ \frac{dv}{dt} = \frac{1}{V} (r_1 - r_2) \\ \frac{dh}{dt} = \frac{2}{\delta} \left(\frac{D}{\delta} (h_0 - h) - r_2 \right) \end{array} \right\} \quad (2),$$

em que Δ e D são coeficientes de difusão da nandrolona e dos prótons, n_0 e h_0 são suas concentrações no interior da solução, V é a concentração superficial máxima do dióxido de vanádio e os parâmetros r , as velocidades das respectivas reações, que se obtêm como:

$$r_1 = k_1 n (1 - v)^2 \qquad r_2 = k_2 v h \exp\left(-\frac{F\phi_0}{RT}\right) \quad (3-4),$$

Em que os parâmetros k são constantes das respectivas reações, F é o número de Faraday, ϕ_0 é o salto do potencial, relativo ao potencial da carga zero, R é a constante universal de gases, T é a temperatura absoluta.

O oxihidróxido de vanádio representa um comportamento eletroquímico flexível. Mas, ao contrário do oxihidróxido de cobalto, por mais semelhante que seja a sua estrutura à do VO(OH), este representa inclinação para os processos catódicos em meios ácidos, o que se mostrará abaixo.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para investigar a estabilidade do estado estacionário do sistema da detecção eletroquímica da nandrolona, assistida por VO(OH), analisamos o conjunto de equações diferenciais (2) mediante a teoria de estabilidade linear. A matriz funcional de Jacobi, cujos membros são calculados para o estado estacionário pode ser descrita como:

$$\begin{pmatrix} a_{11} & a_{12} & a_{13} \\ a_{21} & a_{22} & a_{23} \\ a_{31} & a_{32} & a_{33} \end{pmatrix} \quad (5),$$

em que:

$$a_{11} = \frac{2}{\delta} \left(-\frac{\Delta}{\delta} - k_1(1-v)^2 \right) \quad (6)$$

$$a_{12} = \frac{2}{\delta} (2k_1(1-v)) \quad (7)$$

$$a_{13} = 0 \quad (8)$$

$$a_{21} = \frac{1}{V} (k_1(1-v)^2) \quad (9)$$

$$a_{22} = \frac{1}{V} \left(-2k_1(1-v) - k_2 h \exp\left(-\frac{F\phi_0}{RT}\right) - jk_2 v h \exp\left(-\frac{F\phi_0}{RT}\right) \right) \quad (10)$$

$$a_{23} = \frac{1}{V} \left(-k_2 v \exp\left(-\frac{F\phi_0}{RT}\right) \right) \quad (11)$$

$$a_{31} = 0 \quad (12)$$

$$a_{32} = \frac{2}{\delta} \left(-k_2 b \exp\left(-\frac{F\phi_0}{RT}\right) - jk_2 b \exp\left(-\frac{F\phi_0}{RT}\right) \right) \quad (13)$$

$$a_{33} = \frac{2}{\delta} \left(-k_2 v \exp\left(-\frac{F\phi_0}{RT}\right) - \frac{D}{\delta} \right) \quad (14)$$

Analisando as expressões (6), (11) e (14), que representam os elementos da diagonal principal da matriz, podemos ver que o comportamento oscilatório, neste caso, é possível, porque há, de fato, um elemento, capaz de ser positivo e, por conseguinte, de ser responsável pela positiva conexão de retorno. Como nos sistemas semelhantes, a única causa do comportamento oscilatório neste sistema são as influências do processo da eletrorredução na dupla camada elétrica (DCE), descritas pela positividade do elemento $-jk_2 v b \exp\left(-\frac{F\phi_0}{RT}\right)$. As oscilações se esperam frequentes e de pequena amplitude.

Para analisar a estabilidade do estado estacionário, aplicamos ao conjunto de equações diferenciais (2) o critério de estabilidade de Routh-Hurwitz. Simplificando o jacobiano, introduzimos as novas variáveis, obtendo-lhe o determinante como:

$$\frac{4}{V\delta^2} \begin{vmatrix} -\kappa_1 - \Xi & \Lambda & 0 \\ \Xi & -\Lambda - \Omega & -P \\ 0 & -\Omega & -P - \kappa_2 \end{vmatrix} \quad (15)$$

Abrindo os parênteses e aplicando a condição de $\text{Det } J < 0$, saliente do critério, obtemos a condição de estabilidade como:

$$(-\kappa_1)(\Lambda P + \Lambda \kappa_2 + \Omega \kappa_2) - \Xi(\Omega \kappa_2) < 0 \quad (16),$$

Que é uma expressão típica para um processo eletroanalítico eficiente e estável, controlado pela difusão, como nos casos semelhantes [18-21]. Neste caso, os prótons participam diretamente do processo eletroanalítico e não só a difusão do analito, mas, outrossim, a sua. Assim, o sistema eletroanalítico apresentar-se-á como eficiente, em soluções leve e moderadamente ácidas, pois os prótons participam diretamente da eletrorredução do dióxido de vanádio até VO(OH).

No entretanto, não se pode exagerar o papel estabilizador do estado estacionário, que desempenham os prótons neste sistema. As soluções fortemente ácidas saem do quesito deste modelo, e o comportamento do VO(OH) nelas descrever-se-á num dos nossos próximos trabalhos.

A condição da instabilidade monotônica, relativa ao limite de detecção, para este sistema descreve-se conforme:

$$(-\kappa_1)(\Lambda P + \Lambda \kappa_2 + \Omega \kappa_2) - \Xi(\Omega \kappa_2) = 0 \quad (17),$$

realizando-se, neste ponto, a igualdade das influências estabilizadoras a desestabilizadoras.

Quanto *ao uso do VO(OH) em meio alcalino*, ele pode até ser considerável para apoiar até alguns processos anódicos com alguns analitos, capazes de ser oxidados pelo vanádio tetra ou pentavalente em meio alcalino. VO(OH) interagirá com a hidroxila, formando, a depender da concentração e do potencial anódico, VO₂, VO₃⁻, VO₄³⁻ ou decavanadatos. Sem embargo, a assistência ao processo anódico não é característica para o VO(OH), cujo comportamento é mais favorável para ser mediador de processos catódicos.

CONCLUSÕES

Da análise do comportamento do sistema eletroanalítico, baseado em oxihidróxido de vanádio na detecção eletroquímica da nandrolona, é possível concluir que:

- O oxihidróxido de vanádio pode ser um modificador eficiente na determinação da nandrolona no cátodo. No entretanto, ao contrário do composto análogo de cobalto, o seu comportamento é fortemente inclinado para as propriedades redutoras e, destarte, o seu desempenho eletroanalítico dar-se-á em condições diferentes.
- O processo eletroanalítico é eficiente e controlado pela difusão tanto da nandrolona, como dos prótons. Sem embargo, se o pH do sistema é inferior a certo valor marginal, correspondente à formação dos cátions V³⁺, o presente modelo falhará na descrição do comportamento do sistema, haja vista o serem menosprezadas as influências superficiais e capacitadoras da dissolução do oxihidróxido de vanádio.
- O comportamento oscilatório neste sistema, como nos semelhantes, é possível, sendo causado pelos fatores da influência da eletrorredução na estrutura da dupla camada elétrica.

CONFLITO DE INTERESSES

Os autores declaram que não há conflito de interesses.

REFERÊNCIAS

1. A.J. Higgins, From ancient Greece to modern Athens: 3000 years of doping in competition horses, *J. Vet. Pharm. Ther.*, **29**, 4 (2006).
2. J. Clarke, The doping of racehorses, *Med. Leg. J.*, **30**, 180 (1962).
3. “Ratsch: The Encyclopedia of Psychoactive Plants: Ethnopharmacology and its Applications”, Ed. Park Street Press, Rochester, 2005.
4. R. Kumar, Doping Competing against doping, *Br. J. Sport. Med.*, **44**, 1 (2010).
5. Parliament of Austria, Where in the world is doping a crime? (doping in sports pt. 6), https://www.aph.gov.au/About_Parliament/Parliamentary_Departments/Parliamentary_Library/FlagPost/2013/April/Where_in_the_world_is_doping_a_crime_doping_in_sports_pt_6
6. Wikipedia, Nandrolone sulfate sodium, https://ipfs.io/ipfs/QmXoypizjW3Wkn-FiJnKLwHCnL72vedxjQkDDP1mXWo6uCo/wiki/Nandrolone_sulfate_sodium.html
7. Open Chemistry Database, Nandrolone hydrogen sulfate, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/3085201#section=Top>
8. Index Nominum International Drug Directory, Taylor & Francis, January 2000, pp. 716-717, ISBN 978-3-88763-075-1
9. Drugs and supplement, <https://www.sdrugs.com/?c=ing&s=nandrolone%20sodium%20sulfate>
10. Nandrolone Side Effects, <https://www.drugs.com/sfx/nandrolone-side-effects.html>
11. K.L. Johansen, K. Mulligan, M. Schambelan, Anabolic effects of nandrolone decanoate in patients receiving dialysis: a randomized controlled trial, *JAMA*, **281**, 1275 (1999).
12. J. Mukherjee, A. Das, U.S. Chakrabarty *et al.*, Development and validation of RP HPLC method to determine nandrolone phenylpropionate in different pharmaceutical formulation, *Acta Pol. Pharm.*, **68**, 155 (2011).
13. R.N. Goyal, V.K. Gupta, N. Bachcheti, Fullerene-C60-modified electrode as a sensitive voltammetric sensor for detection of nandrolone--an anabolic steroid used in doping, *Anal. Chim. Acta*, **597**, 82 (2007).

14. D.M.W. Arrigan, "Electrochemical Strategies in Detection Sciences", RSC Edition, London, 2016.
15. W. Jin, Y. Zheng, X. Chen, Adsorption Voltammetry of nandrolone phenylpropionate, *Electroanal.*, **9**, 498 (1997).
16. Y. Zhang, X. Jing, Hydrothermal synthesis and supercapacitor electrode of low crystallinity VOOH hollow spheres with pseudocapacitance in aqueous solution, *Mat. Lett.*, **205**, 1 (2017).
17. O. Stadnik, "Synthesis electrochemical and photoelectrochemical properties of the oxide-hydroxide compounds of cobalt", Diss. Kand. Chim. N.-Kyiv., 2011.
18. O. Stadnik, N. Ivanova, Y. Boldyrev, Int. Electrochem. Soc. Meeting. Abstract, **2240**, <http://ma.ecsdl.org/content/MA201002/38/2240.full.pdf>
19. V. Tkach, Ya.G. Ivanushko, S.M. Lukanova *et al.*, The theoretical evaluation for the possibility of CoO(OH)-assisted electroanalytical pyriproxyfen detection in water, *Appl. J. Envir. Eng. Sci.*, **3**, 90 (2017).
20. V. Tkach, S.C. de Oliveira, F.J. Anaissi *et al.*, The Possibility of the use of CoO(OH) as an electrode modifier for hydrazine detection and its mathematical evaluation, *Anal. Bioanal. Electrochem.*, **8**, 557 (2016).
21. V. Tkach, Ya. Ivanushko, S.C. de Oliveira *et al.*, The theoretical evaluation of the possibility of CoO(OH)-assisted omeprazole electrochemical detection, *Anal. Bioanal. Electrochem.*, **8**, 749 (2016).

COMO CITAR ESTE ARTIGO

V.V. Tkach, Y.G. Ivanushko, S.M. Lukanova, S.C. de Oliveira, F.J. Anaissi, N.M. Storooshchuk, P. I. Yagodynets', Avaliação teórica do uso do oxihidróxido de vanádio trivalente na detecção eletroquímica de nandrolona, *Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm.*, **47**(3), 400-409 (2018).

Extracción y encapsulación de compuestos fenólicos provenientes de cascarilla de arroz

Deisy Sánchez-Molina¹, Mayra Vargas-Porras¹, Rodrigo Ortega-Toro², Yineth Piñeros-Castro^{1*}

¹ Universidad de Bogotá Jorge Tadeo Lozano, Facultad de Ingeniería, Departamento de Ingeniería Química, Carrera 4 # 22-61, Bogotá D.C., Colombia.

* Correo electrónico: yineth.pineros@utadeo.co

² Universidad de Cartagena, Facultad de Ingeniería, Programa de Ingeniería de los Alimentos, Carrera 6 # 36-100, Cartagena de Indias D.T. y C., Colombia. Correo electrónico: rortegap1@unicartagena.edu.co.

Recibido para evaluación: 22 de febrero de 2018

Aceptado para publicación: 24 de septiembre de 2018

RESUMEN

En la actualidad, el aprovechamiento de los subproductos agroindustriales es de vital importancia. El objetivo del presente trabajo fue estudiar una alternativa de valorización de la cascarilla de arroz, mediante la extracción y la encapsulación de compuestos fenólicos provenientes de las cascarillas. Este proceso fue llevado a cabo en un reactor batch con agitación mecánica a 453,15 K y 1 MPa durante 1 h, se usó agua como solvente. Se evaluó la micro-encapsulación de los componentes del extracto mediante liofilización usando como material encapsulante maltodextrina en diferentes proporciones.

Los extractos acuosos mostraron un pH de 3,7, contenido de compuestos fenólicos de 8,2 mg equivalentes de ácido gálico/g de cascarilla, y una actividad antioxidante de 14,6 mg Eq.trolox/g de cascarilla. Mediante análisis de espectroscopía de infrarrojo se identificaron bandas representativas de grupos funcionales presentes en los compuestos fenólicos, reconocidos por su actividad antioxidante. La eficiencia de encapsulación fue de 99,8 % usando 14,3 % de maltodextrina, se obtuvieron cápsulas con 10,08 mg fenoles/g de encapsulado y un tamaño de partícula adecuado para la liberación y retención de los compuestos fenólicos de 63 μm . Posteriormente, se estudió la estructura semicristalina de las cápsulas mediante difracción de rayos X.

Como conclusión, estas microcápsulas antioxidantes pueden ser adecuadas para su utilización en la industria farmacéutica o de alimentos como componente de envases alimentarios.

Palabras clave: Subproducto, actividad antioxidante, compuestos fenólicos, liofilización, maltodextrina.

SUMMARY

Extraction and encapsulation of phenolic compounds from rice hus

Currently, the use of agro-industrial by-products is of vital importance. The aim of the present work was to study an alternative of valorisation of the rice husk, by extraction and encapsulation of phenolic compounds from the husks. This process was carried out in a batch reactor with mechanical stirring at 453.15 K and 1 MPa for 1 h, water was used as the solvent. Microencapsulation of the extract components was evaluated by lyophilisation using maltodextrin at different proportions as encapsulating material. The aqueous extracts showed a pH of 3.7, contained phenolic compounds of 8.2 mg gallic acid/g of husk, and an antioxidant activity of 14.6 mg Eq.trolox/g of husk. By infrared spectroscopy analysis, representative bands of functional groups present in the phenolic compounds, recognised for their antioxidant activity, were identified. The encapsulation efficiency was 99.8 % using 14.3 % maltodextrin; capsules were obtained with 10.08 mg phenols/g capsules and a particle size suitable for the release and retention of phenolic compounds of 63 μm . Subsequently, the semi-crystalline structure of the capsules was studied by X-ray diffraction. To conclude, these antioxidant microcapsules may be suitable for use in the pharmaceutical or food industry as a component of food packaging.

Key words: By-product, antioxidant activity, phenolic compounds, freeze-drying, maltodextrin.

INTRODUCCIÓN

El arroz es uno de los alimentos básicos en distintas culturas del mundo y hace parte relevante en la dieta de los colombianos. En Colombia, el arroz tiene un área de cultivo de 478.878 hectáreas de superficie de arroz Paddy seco, con una producción cercana a los dos millones de toneladas por semestre [1] mientras que a nivel global la producción de arroz en el mundo alcanza 638 millones de toneladas en el año [2]. De la totalidad de arroz producido se estima que un 20 % w/w corresponde a cascarilla de arroz [3].

La cascarilla de arroz es considerada como un material de bajo valor agregado, su principal inconveniente es la baja biodegradabilidad, por lo que se acumula en grandes cantidades. Uno de los usos comunes es su aprovechamiento como combustible, luego de la incineración son arrojados a fuentes de agua y suelo, lo que repercute negativamente en el medio ambiente [4]. La cascarilla es un material de carácter frágil, abrasivo, de densidad baja, peso específico de 125 kg/m^3 y poder calorífico de $3281,6 \text{ Kcal/kg}$ [5].

Respecto a sus características orgánicas, su composición puede variar de acuerdo con la región del mundo donde se cultiven. La cascarilla de arroz está compuesta por alrededor de 82 g de material orgánica/100 g de biomasa, alrededor de 40 % de celulosa, aproximadamente 19 % hemicelulosa y por cerca de 14 % de lignina. Adicionalmente se encuentran polisacáridos como xilosa, arabinosa y galactosa [6].

De otro lado, la cascarilla de arroz es una cubierta que protege al grano del potencial oxidante del medio exterior. Entre los componentes de la cascarilla, la lignina se destaca por su elevado contenido de estructuras fenólicas, las cuales pueden dar origen a compuestos fenólicos de alto valor agregado, ya que se ha demostrado que estas estructuras son captadoras de radicales libres [7]. Entre los componentes antioxidantes presentes en la cascarilla de arroz se destacan el ácido vainillínico y p-cumárico [8]. También se ha reportado que contiene compuestos antioxidantes como anisol, vainillina y siringaldehído [9]. Estas características convierten a la cascarilla de arroz en una fuente importante de antioxidantes naturales que puede ser aprovechada.

Dado que la mayoría de los compuestos antioxidantes fenólicos de la planta se encuentran en forma de unión covalente a un polímero insoluble, es necesario establecer un método de procesamiento eficaz para la liberación de estos componentes [8]. Algunas investigaciones han planteado procesos para el aprovechamiento de los compuestos activos de este material lignocelulósico, utilizando hidrólisis ácida y alcalina a diferentes temperaturas [2]; también se han evaluado diferentes solventes como acetona, etanol, y agua a diferentes temperaturas, encontrando las mayores actividades antioxidantes con agua [9].

Por otro lado, es necesario encapsular los antioxidantes para su protección de condiciones ambientales adversas como luz, oxígeno, humedad y temperatura, generando en el producto activo una vida útil más prolongada y facilitando su manipulación [10], para lo cual se usan agentes encapsulantes, que varían dependiendo de la finalidad del producto deseado así como la afinidad con el componente bioactivo. Estos materiales pueden ser puros o mezclas compuestas de diversas sustancias como azúcares, gomas, proteínas, polisacáridos, lípidos y polímeros. En diversos estudios se ha implementado la maltodextrina como material encapsulante dada su efectividad para la conservación de componentes antioxidantes [11, 12]. Entre los métodos de encapsulación se suele usar el secado por aspersión, coacervación, emulsión, liposomas, micro o nano-encapsulación y liofilización.

Esta última se utiliza en la conservación de moléculas sensibles a la temperatura o con alto contenido de aromas y ha sido efectivo en la encapsulación utilizando maltodextrina, ya que ofrece una adecuada protección de los componentes fenólicos durante el almacenamiento [10].

En este trabajo se estudió la encapsulación de los compuestos del extracto acuoso de cascarilla de arroz con maltodextrina mediante liofilización como estrategia de valorización de este material lignocelulósico, fuente de compuestos con actividad antioxidante.

METODOLOGÍA

Materiales

La cascarilla de arroz provenía del Espinal-Tolima, Colombia, la cual fue molida hasta un tamaño de $0,45 \mu\text{m}$ usando un molino de martillos. Se utilizó maltodextrina grado USP. Los reactivos Folin-Ciocalteu a 2N, 2,2-difenil-1-picrilhidracilo, ácido gálico, trolox, hidróxido de potasio y carbonato de potasio fueron grado analítico de Sigma-Aldrich. La cascarilla de arroz antes y luego de la extracción fue caracterizada en cuanto a su contenido de cenizas, lignina y carbohidratos totales de acuerdo con la metodología de reportada por National Renewable Energy Laboratory [13].

Obtención y caracterización de extracto antioxidante. Se utilizaron 400 g de cascarilla de arroz por cada litro de agua en la extracción. La cascarilla se dejó en remojo durante 24 h a temperatura ambiente previo a la extracción, la cual se realizó en un reactor batch de acero inoxidable 316 de 2 L de capacidad, con agitación mecánica a 200 rpm, temperatura de 453,15 K y presión manométrica de 1 MPa, durante 1 h. Se separó por filtración el extracto, se determinó el volumen, pH, actividad antioxidante, contenido de polifenoles totales y se identificaron los grupos funcionales de compuestos fenólicos por FTIR. La capacidad antioxidante de los diferentes extraíbles se analizó mediante el método propuesto por Kim *et al.* [14] en el que se analiza la reducción del radical libre del componente 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH). Para el contenido de fenoles totales presentes en los extraíbles se empleó el método de Folin-Ciocalteu [15]. Finalmente, con el fin de determinar los grupos funcionales presentes en el extracto seco se realizó un análisis de espectrometría utilizando Infra Rojo con Transformada de Fourier (FTIR), en espectrofotómetro Agilent Technologies (Cary 630 FTIR, USA).

Encapsulación del extracto antioxidante. Para realizar el microencapsulado mediante liofilización se utilizó como agente encapsulante maltodextrina comercial grado USP. Para esto se prepararon soluciones con distintas concentraciones de maltodextrina 0,25 (E1), 0,15 (E2), 0,125 (E3) y 0,1 (E4) g/cm^3 , las cuales fueron adicionadas en un volumen de 10 cm^3 a 20 cm^3 del extracto. Para la microencapsulación se utilizó el método

descrito por Deladino *et al.* [11]. Las mezclas se calentaron a 323,15 K con agitación constante de 100 rpm durante 1 h, hasta obtener una mezcla homogénea. Luego se enfriaron a temperatura ambiente y posteriormente se liofilizaron. La liofilización se llevó a cabo en un equipo a escala del laboratorio a 223,15 K y 0,2 MPa.

Caracterización fisicoquímica de las microcápsulas. La determinación del tamaño de partícula, se realizó por un tamizado en tamiz portable Sieve Shaker Moler (Ro-Tap, WS Tyler, Inc., Mentor, Ohio) haciendo un análisis diferencial. Se midió la densidad aparente según Kaderides *et al.* [16]. Finalmente, el porcentaje de humedad se midió por medio de método gravimétrico con una balanza de humedad Mettler Toledo HB43-S Halogen Classic Plus a 105° C. Mediante difracción de rayos X se determinó la estructura semicristalina del material empleando un difractómetro automático Shimadzu XRD-6000, las muestras fueron analizadas a temperatura ambiente con una humedad relativa de 53 %, entre 2θ : 5°-80°, usando una radiación de $K\alpha$ -Cu, con una longitud de onda de 1542 Å, 40 Kv, 40 mA y un tamaño de paso de 0,05°.

El contenido de fenoles totales presentes en el material encapsulado se determinó mediante Folin-Ciocalteu [15]. Se disolvió una cantidad conocida de encapsulado en 2 cm³ de agua con el fin de solubilizar el material encapsulante correspondiente a la maltodextrina. De igual forma se realizó extracción con etanol 96 % y se procedió a hacer la determinación del contenido de fenoles totales. Con los resultados obtenidos se determinó el porcentaje de liberación y la eficiencia de encapsulación teniendo en cuenta la relación entre el total de extracto en las microcápsulas (TE) y el total de extracto en la superficie del encapsulado (SUE), según Davidov-Pardo *et al.* [17].

Análisis estadístico. Los datos obtenidos fueron tratados mediante un análisis de varianza (Anova) usando el *software* Statgraphics Plus para Windows (Manugistics Corp., Rockville, MD). También se realizó el teste de Fisher de mínimas diferencias significativas (LSD) con un 95 % de confianza.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Obtención y caracterización del extracto

En la tabla 1 se encuentran los datos de caracterización de la fracción sólida obtenida luego de la extracción realizada a 453,15 K y 1 MPa durante 1 h.

El material extraído presenta un porcentaje mayor de lignina que en el material sin tratar, debido a que la condición de la temperatura utilizada permite una mayor solubilización de la hemicelulosa permitiendo tener disponible los compuestos fenólicos característicos de la lignina en la cascarilla de arroz [18]. Así mismo se puede apreciar lo que otros autores afirman respecto a la composición de ceniza, dado que la cascarilla de

arroz contiene aproximadamente 10 % a 17 % de óxido de silicio [19], lo cual puede ser aprovechado como agente de refuerzo en la fabricación de materiales compuestos [20].

Tabla 1. Composición de la cascarilla de arroz antes y luego de la extracción acuosa.

Muestras	Cenizas (%)	Lignina (%)	Carbohidratos (%)
Cascarilla de arroz sin pretratar	20,27 ± 2,14 ^a	29,5 ± 0,5 ^a	50,3 ± 3,4 ^a
Fracción sólida luego de la extracción	19,9 ± 0,8 ^a	33,4 ± 2,6 ^b	46,6 ± 1,7 ^b

Letras superíndices diferentes en la misma columna indican diferencias significativas ($p < 0,05$ %).

Con relación a la fase líquida se encontró un valor de pH ácido debido a la producción de ácido acético dado por los rompimientos de los grupos aceto presentes en los azúcares. En cuanto a los valores de actividad antioxidante y compuestos fenólicos, estos fueron similares a los obtenidos en estudios previos [18]. Este proceso trae como beneficio la no implementación de sustancias químicas contaminantes al medio ambiente, así como la generación de un proceso industrial más eficiente, dado que en este no se tendría que neutralizar la muestra para posteriores implementaciones en sectores alimenticios y cosméticos y se utiliza agua como solvente.

Al comparar los resultados con los reportados por Martins *et al.* [2], quienes obtuvieron extractos ricos en antioxidantes a partir de cascarilla de arroz, mediante métodos alcalinos y ácidos, se observa que los extractos de la presente investigación tienen mayor concentración de componentes fenólicos. Es posible inferir que la extracción con agua a 453,15 K y 1 MPa de presión permite el acceso a los compuestos antioxidantes, principalmente restos fenólicos que se solubilizan y que se derivan de la lignina [21].

Tabla 2. Valores medios y desviación estándar de pH, fenoles totales y actividad antioxidante del extracto líquido.

Característica	Extracto líquido
pH	3,4 ± 0,2
Fenoles totales (mg equivalentes de AG/g biomasa seca)	8,2 ± 0,6
Fenoles totales (mg de equivalentes de AG/L)	1024,1 ± 0,5
Actividad antioxidante (mg de equivalentes de trolox/g biomasa seca)	14,6 ± 0,2
Actividad antioxidante (mg de equivalentes de trolox /L)	1831,6 ± 0,3
Sólidos solubles g/L	111,40 ± 8,24

Por otro lado, la figura 1 muestra el espectro infrarrojo del extracto seco obtenido, se puede apreciar una banda ancha a $\text{IR n max } 3380 \text{ cm}^{-1}$ correspondiente al grupo $-\text{OH}$; las bandas localizadas en el rango $\text{IR n max de } 1670\text{-}1280 \text{ cm}^{-1}$ indican presencia de grupos $\text{C}=\text{O}$, mientras que en el rango $\text{IR n max de } 1620 \text{ a } 1530 \text{ cm}^{-1}$ se observan bandas $\text{C}=\text{C}$ típicas de grupos aromáticos, siendo representativas de diferentes extractos fenólicos [11].

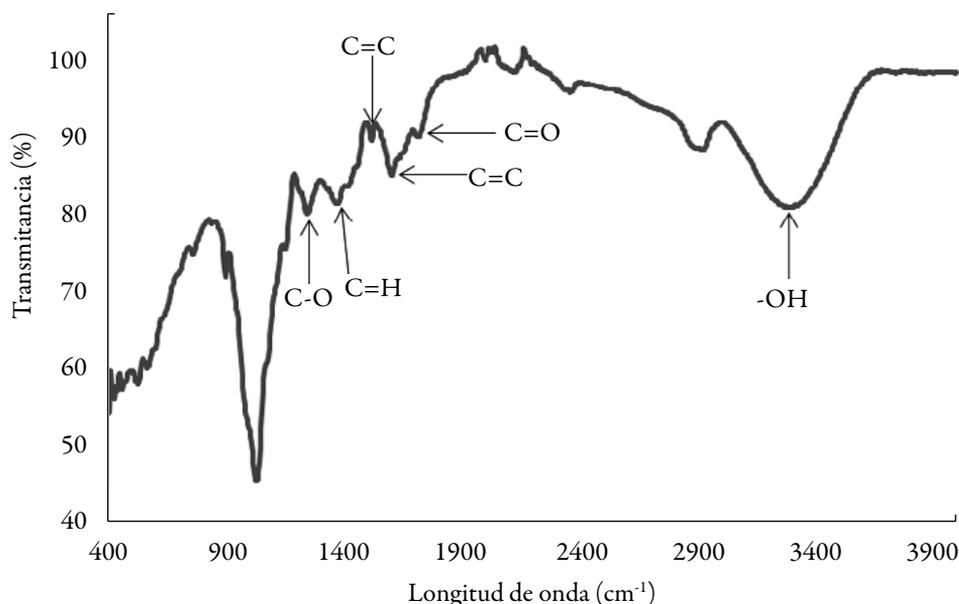


Figura 1. Espectro FTIR de los sólidos soluble en el extracto acuoso obtenido.

Encapsulación del extracto antioxidante

Para mantener la estabilidad y actividad antioxidantes de los compuestos fenólicos presentes en el extracto líquido obtenido de la cascarilla de arroz es necesario limitar su interacción con el oxígeno y la luz, debido a que la estructura química se modifica por reacciones secundarias [22, 23].

El extracto líquido obtenido a partir de la cascarilla de arroz fue encapsulado mediante liofilización usando como material encapsulante maltodextrina. En la tabla 3 se presenta información sobre la caracterización de las microcápsulas obtenidas.

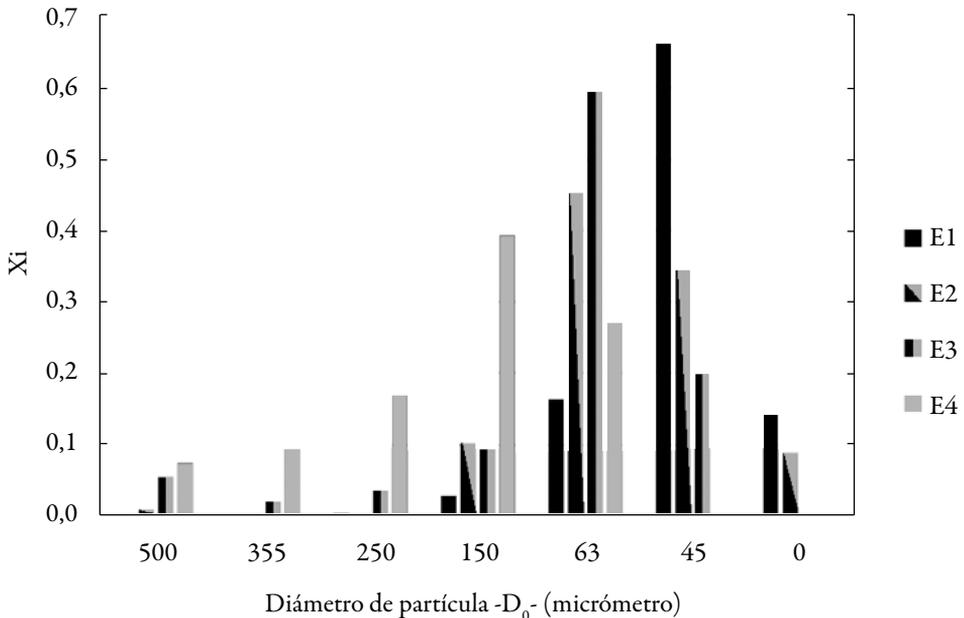
Según los resultados, a mayor contenido de extracto en el microencapsulado, mayor será la cantidad de compuestos fenólicos, debido principalmente a que contiene la menor cantidad de maltodextrina y por lo tanto una mayor proporción de los sólidos solubles en el extracto. Se observa que los valores de humedad son similares y los valores de densidad aparente oscilan entre 1,5 y 0,6. Posiblemente la concentración de la maltodextrina promueva un aumento en la densidad de las microcápsulas.

Tabla 3. Características de las microcápsulas, valores medios y desviación estándar del contenido de fenoles (mg fenoles/ g microencapsulado), humedad (%) y densidad aparente (g/cm^3).

Ensayo	Concentración de la maltodextrina g/cm^3 solución	Contenido de fenoles solubles en agua	Humedad	Densidad aparente
E1	0,25	$7,22 \pm 1,5^a$	$4,6 \pm 0,9^a$	$1,3 \pm 0,4^b$
E2	0,15	$10,26 \pm 3,37^{ab}$	$4,7 \pm 1,2^a$	$1,5 \pm 0,4^b$
E3	0,125	$12,41 \pm 2,9^{ab}$	$4,5 \pm 0,7^a$	$0,9 \pm 0,3^a$
E4	0,10	$14,92 \pm 3^b$	$4,3 \pm 1,0^a$	$0,6 \pm 0,2^a$

Letras superíndices diferentes en la misma columna indican diferencias significativas ($p < 0,05$ %).

En la figura 2 se encuentra la distribución de tamaños de partícula de las microcápsulas. Esto se determinó mediante un análisis diferencial de tamizado. El tamaño de las microcápsulas determinarán su comportamiento durante su uso práctico. Con partículas de tamaño pequeño se podría usar como componente de una matriz polimérica de propiedades activas. Se observa una curva de distribución del tamaño donde más del 50 % de las microcápsulas de cada ensayo se encuentran entre $63 \mu\text{m}$ y $45 \mu\text{m}$. Las variaciones que se pueden presentar dependen de la proporción entre el extracto líquido y el material encapsulante. El tamaño de partícula afectará directamente la densidad aparente. Cuando la densidad aparente fue muy baja, la manipulación del material fue difícil debido a su facilidad de dispersarse en el aire.

**Figura 2.** Distribución de tamaño de partícula de los tratamientos estudiados.

Por otro lado se analizó la estructura de las microcápsulas por medio de difracción de rayos X, tal como se presenta en la figura 3. Para este análisis se consideró el material previamente seleccionado E2 y se tomaron muestras de los tamaños de partícula más representativos ($63\mu\text{m}$ y $45\mu\text{m}$).

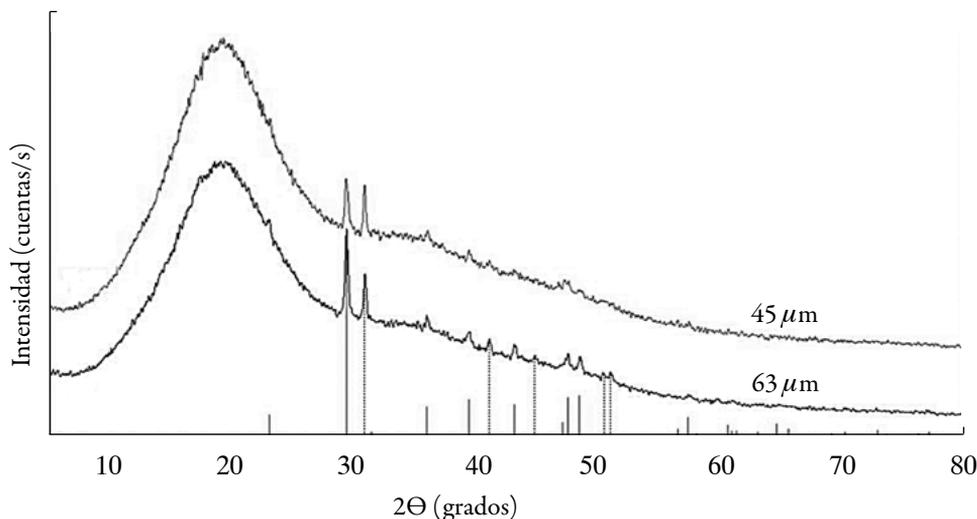


Figura 3. Difracción de rayos X del material E2.

Los difractogramas muestran la estructura de las microcápsulas como un sólido semi-cristalino. La banda ancha a 2θ : 20° , aproximadamente, representa la parte amorfa y los picos finos a 2θ : $29,2^\circ$, $30,7^\circ$, $39,4^\circ$, $41,2^\circ$, $44,7^\circ$, $48,3^\circ$ y $50,2^\circ$, las formaciones cristalinas. La liofilización conlleva un proceso lento de sublimación de agua congelada, las condiciones de este proceso son adecuadas para que el sólido resultante tenga tanto zonas vítreas como zonas cristalinas [24]. El microencapsulado $63\mu\text{m}$ presentó estructura más cristalina indicando mejor organización de la estructura y mayor estabilidad del extracto encapsulado bajo las condiciones del ensayo E2.

Liberación de compuestos fenólicos según el tamaño de partícula

De cara al aprovechamiento de los microencapsulados en la industria cosmética o alimentaria (envasado y embalaje) se procedió a hacer el estudio de la liberación de los compuestos polifenólicos en agua. La figuras 4 muestra la capacidad de liberación del producto activo en medio acuoso para los diferentes contenidos de maltodextrina con tamaños de partícula de $63\mu\text{m}$ y $45\mu\text{m}$. No se observan diferencias significativas para los tratamientos E1 y E2. Tampoco se observan diferencias marcadas entre los dos tamaños de partícula a los mismos contenidos de maltodextrina. El porcentaje de

liberación en agua en cada ensayo es mayor al 91 %, debido a que el material encapsulante posee gran afinidad por el agua [25]. Esto genera migración rápida del extracto desde interior de las cápsulas hacia el medio acuoso. La microencapsulación se confirmó ya que en todos los casos la liberación de los compuestos fenólicos luego del lavado con etanol fue muy baja, con un valor promedio del 0,01 % de los compuestos fenólicos.

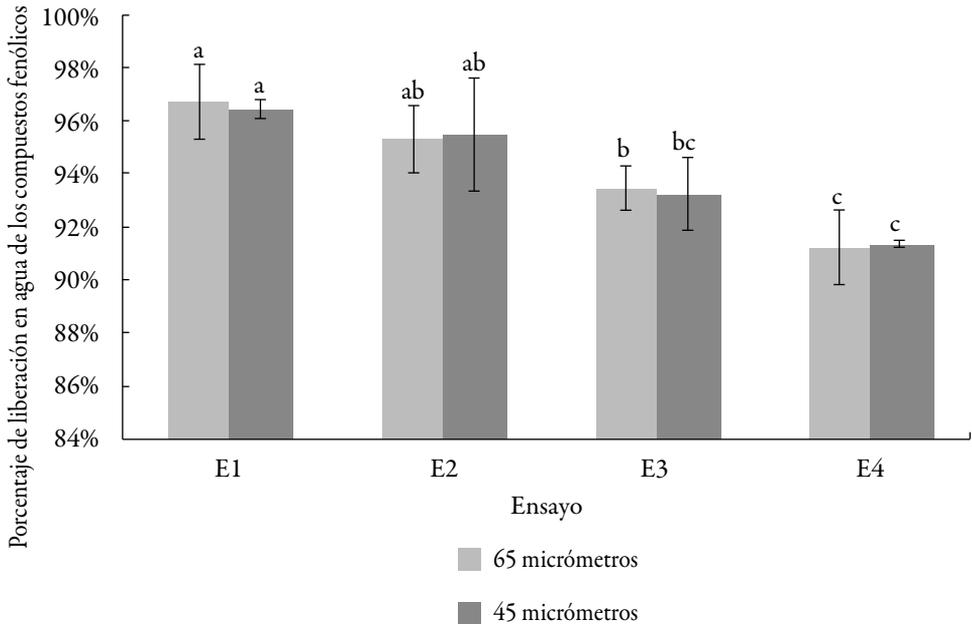


Figura 4. Liberación de compuestos fenólicos para cada uno de los ensayos para dos tamaños de partícula: 63 μm (barras lisas) y 45 μm (barras subdivididas). Barras de error y grupos homogéneos ($p < 0,05$ %).

De acuerdo a los resultados, un contenido de maltodextrina del material obtenido bajo las condiciones del ensayo E2, que contiene 11,1 g/100 cm^3 de mezcla a liofilizar, es el más adecuado para la encapsulación; este porcentaje de maltodextrina es similar a lo encontrado por otros autores, quienes reportan un valor entre 14 % a 18 % [12] generando productos más estables, de características más adecuadas para la manipulación y con una capacidad de liberación de compuestos antioxidantes en medio acuoso alta.

CONCLUSIONES

El extracto líquido proveniente del pretratamiento con agua caliente a 453,15 K, 1 MPa durante 1 h, de la cascarilla de arroz, permite una adecuada extracción de compuestos fenólicos con actividad antioxidante, obteniendo valores de concentración de antioxidantes de 14,6 mg Eq.trolox/g biomasa seca y de componentes fenólicos equivalentes a 8,2 mg Eq.AG/g biomasa seca. El desarrollo de microencapsulados con actividad antioxidante ofrece alternativas a la industria cosmética y alimentaria para generar productos de alto valor agregado aprovechando residuos agroindustriales. Las cápsulas obtenidas con 11,1 % (p/v) de maltodextrina presentan alta eficiencia de encapsulación y liberación, generando un material sólido con estructura semicristalina. El tamaño de partícula más adecuado fue 63µm, ya que permitió la liberación y retención del producto activo, con características adecuadas para su manipulación y estabilidad a condiciones ambientales.

AGRADECIMIENTOS

Los autores de este trabajo agradecen a la Universidad de Bogotá Jorge Tadeo Lozano y Universidad de Cartagena por el apoyo en la ejecución de este trabajo.

CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaran no tener conflicto de interés en la realización de este trabajo.

REFERENCIAS

1. Departamento Administrativo Nacional de Estadísticas, Cuarto censo nacional arrocero, <http://www.dane.gov.co/files/investigaciones/agropecuario/censo-nacional-arrocero/boletin-tecnico-4to-censo-nacional-arrocero-2016.pdf>, consultado en febrero de 2018.
2. V. Vadivel, P. Brindha, Antioxidant property of solvent extract and acid/alkali hydrolysates from rice hulls, *Food Bioscience*, **11**, 85 (2015).
3. N. Soltani, A. Bahrami, M.I. Pech-Canul, L.A. González, Review on the physicochemical treatments of rice husk for production of advanced materials, *Chemical Engineering Journal*, **264**, 899 (2015).

4. R.S. Bie, X.F. Song, Q.Q. Liu, X.Y. Ji, P. Chen, Studies on effects of burning conditions and rice husk ash (RHA) blending amount on the mechanical behavior of cement, *Cement and Concrete Composites*, **55**, 162 (2015).
5. A. F. Castro, “Estabilización de suelos arcillosos con ceniza de cascara de arroz para el mejoramiento de subrasante”, Tesis de Ingeniería Civil, Universidad Nacional de Ingeniería de Perú, (2017).
6. S. Zhang, Q. Dong, L. Zhang, Y. Xiong, Effects of water washing and torrefaction on the pyrolysis behavior and kinetics of rice husk through TGA and Py-GC/MS, *Bioresource Technology*, **199**, 352 (2016).
7. W. Wang, J. Guo, J. Zhang, J. Peng, T. Liu, Z. Xin, Isolation, identification and antioxidant activity of bound phenolic compounds present in rice bran, *Food Chemistry*, **171**, 40 (2015).
8. P. Wanyo, N. Meeso, S. Siriamornpun, Effects of different treatments on the antioxidant properties and phenolic compounds of rice bran and rice husk, *Food Chemistry*, **157**, 457 (2014).
9. P. Wanyo, N. Kaewseejan, N. Meeso, S. Siriamornpun, Bioactive compounds and antioxidant properties of different solvent extracts derived from Thai rice by-products, *Applied Biological Chemistry*, **59**, 373 (2016).
10. S. Ray, U. Raychaudhuri, R. Chakraborty, An overview of encapsulation of active compounds used in food products by drying technology, *Food Bioscience*, **13**, 76 (2016).
11. L. Deladino, P.S. Anbinder, A.S. Navarro, M.N. Martino, Encapsulation of natural antioxidants extracted from *Ilex paraguariensis*, *Carbohydrate Polymers*, **71**, 126 (2008).
12. M.J. Ramírez, N.Y. Salgado-Aristizabal, C.E. Orrego-Alzate, Conservación de polifenoles en un jugo de fruta modelo secado por aspersión y liofilización, *Vitae*, **19**, S87 (2012).
13. A. Sluiter, B. Hames, R. Ruiz, C. Scarlata, J. Sluiter, D. Templeton, D. Crocker, Determination of Structural Carbohydrates and Lignin in Biomass, Laboratory Analytical Procedure of National Renewable Energy Laboratory, NREL/TP-510-42618 (2012).

14. J.H. Kim, J.L. Noh, S. Lee, J. Choi, H. Suh, H. Chung, Y. Song, W. Choi, The first total synthesis of 2,3,6-tribromo-4,5-dihydroxybenzyl methyl ether (TDB) and its antioxidant activity, *Bulletin of the Korean Chemical Society*, **23**, 661 (2002).
15. L.Y. Chen, C.W. Cheng, J.Y. Liang, Effect of esterification condensation on the Folin–Ciocalteu method for the quantitative measurement of total phenols, *Food Chemistry*, **170**, 10 (2015).
16. K. Kaderides, A.M. Goula, K.G. Adamopoulos, A process for turning pomegranate peels into a valuable food ingredient using ultrasound-assisted extraction and encapsulation, *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, **31**, 204 (2015).
17. G. Davidov-Pardo, I. Arozarena, M.R. Marín-Arroyo, Optimization of a wall material formulation to microencapsulate a grape seed extract using a mixture design of experiments, *Food and Bioprocess Technology*, **6**, 941(2013).
18. Y. Piñeros, A. Otalvaro, A. Campos, W. Cortés, J. Proaños, G. Velazco, “Aplicación de tecnologías para el aprovechamiento de la cascarilla de arroz”, Editorial Universidad de Bogotá Jorge Tadeo Lozano, Bogotá D.C., 2011, Vol. 1, p. 35.
19. R. Pode, Potential applications of rice husk ash waste from rice husk biomass power plant, *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, **53**, 1468 (2016).
20. S.K. Yeh, C.C. Hsieh, H.C. Chang, C. Yen, Y.C. Chang, Synergistic effect of coupling agents and fiber treatments on mechanical properties and moisture absorption of polypropylene–rice husk composites and their foam, *Composites Part A*, *Applied Science and Manufacturing*, **68**, 313 (2015).
21. W.G. Ortiz, Tratamientos aplicables a materiales lignocelulósicos para la obtención de etanol y productos químicos, *Revista de Tecnología*, **13**, 39 (2016).
22. N. Martins, L. Barros, M. Dueñas, C. Santos, I. Ferreira, Characterization of phenolic compounds and antioxidant properties of *Glycyrrhiza glabra* L. rhizomes and roots, *Royal Society of Chemistry Advances*, **5**, 26991 (2015).
23. Y. Zhao, B. Huang, C. Yang, W. Xia, Visible-Light-Promoted direct amination of phenols via oxidative cross-dehydrogenative coupling reaction, *Organic Letters*, **18**, 3326 (2016).
24. D. Xu, L. Wei, R. Guangyue, L. Wenchao, L. Yunhong, Comparative study on the effects and efficiencies of three sublimation drying methods for mushrooms, *International Journal of Agricultural and Biological Engineering*, **8**, 91 (2015).

25. B. Nurhadi, Y.H. Roos, V. Maidannyk, Physical properties of maltodextrin DE 10: Water sorption, water plasticization and enthalpy relaxation, *Journal of Food Engineering*, **174**, 68 (2016).

CÓMO CITAR ESTE ARTÍCULO

D. Sánchez-Molina, M. Vargas-Porras, R. Ortega-Toro, Y. Piñeros-Castro, Extracción y encapsulación de compuestos fenólicos provenientes de cascarilla de arroz, *Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm.*, **47**(3), 410-423 (2018).

Validación de una metodología analítica por HPLC-DAD para la cuantificación de ácido benzoico complejado, en un ensayo de permeación transdérmica *in vitro* empleando piel de cerdo

Laura A. Martínez¹, Jorge A. Martínez², 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 # 45-03, Bogotá D.C., (111311), Colombia. A. A. 14490.

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

² Universidad Nacional de Colombia - Sede Bogotá, Facultad de Ciencias, Departamento de Farmacia, Grupo de Investigación Aseguramiento de la Calidad, Carrera 30 # 45-03, Bogotá D.C., (111311), Colombia. A. A. 14490. Correo electrónico: jamartinezra@unal.edu.co.

Recibido para evaluación: 24 de abril de 2018

Aceptado para publicación: 26 de septiembre de 2018

RESUMEN

En el presente estudio se realizó la validación de una metodología analítica por cromatografía líquida de alta eficiencia con detector de arreglo de diodos (HPLC-DAD) para la cuantificación del ácido benzoico en complejos polielectrolíticos, obtenidos con Eudragit® E100. Para ello se evaluaron las características de desempeño determinando que la metodología es selectiva; lineal en el rango de concentraciones de 2 a 10 µg/mL; precisa con un RSD inferior a un 2%; exacta con un porcentaje de recuperación de un 98,7% y se establecieron límites de cuantificación (LOQ) de 0,72 y de 1,56 µg/mL para el sistema y método respectivamente. De acuerdo a estos resultados, la metodología analítica es adecuada para evaluar la permeación *in vitro*, del ácido benzoico incluido en los complejos polielectrolíticos a través de piel porcina, empleando celdas de Franz.

Palabras clave: Validación, ácido benzoico, HPLC-DAD, permeabilidad, piel de cerdo, celdas de Franz.

SUMMARY

Validation of an analytical methodology by HPLC-DAD for the quantification of complexed benzoic acid, in an *in vitro* transdermal permeation assay using pig skin

This paper presents the studies carried out about the validation of an analytical methodology by high performance liquid chromatography with diode array detector (HPLC-DAD) for the quantification of benzoic acid in polyelectrolyte complexes obtained with Eudragit® E100. Performance characteristics of the methodology were evaluated, finding that this is selective; linear in the concentration range of 2 to 10 $\mu\text{g} / \text{mL}$; accurate with a RSD of less than 2%, exact with a recovery percentage of 98.7% and quantification limits of 0.72 and 1.56 $\mu\text{g} / \text{mL}$ were established for the system and method respectively. According with this results, the analytical methodology is adequate to evaluate the *in vitro* permeation of benzoic acid, in polyelectrolyte complexes, through porcine skin in Franz cells.

Key words: Vitamin C, titrimetry, content determination, quality control.

INTRODUCCIÓN

La contaminación microbiana en los productos farmacéuticos y cosméticos puede afectar significativamente la calidad y el rendimiento del producto debido a la alteración de las propiedades fisicoquímicas, de vida útil y funcionalidad [1]. Una amplia gama de preservantes son utilizados para contrarrestar este tipo de inestabilidades, los cuales evitan la descomposición de productos terminados al inhibir el crecimiento de bacterias y hongos [2].

El ácido benzoico (ver figura 1) es empleado como preservante de alimentos, cosméticos y productos farmacéuticos presentando una actividad antimicrobiana máxima en valores de pH entre 2,5 y 4,5. A pesar de ser considerado como una sustancia inocua, se han reportados posibles efectos toxicológicos como la generación de urticaria, eritema, escozor, asma e irritación cuando se aplica tópicamente [3], razón por la cual se deben evaluar estrategias que mejoren su perfil de seguridad. Una de las alternativas reportadas para optimizar las características funcionales y de seguridad de los preservantes de carácter ácido, como lo es el benzoico, es la formación de complejos polielectrolíticos, los cuales se generan por medio de las interacciones iónicas de las moléculas involucradas [4].

En el presente estudio se emplearon dos complejos polielectrolíticos con el ácido benzoico representados como: $EuB_{75}Cl_{25}$ y EuB_{100} , donde Eu corresponde al polielectrolito Eudragit E100, B al ión benzoato y Cl al ión cloruro que actúan como contraiones. Los subíndices indican el porcentaje en el que cada contraión está neutralizando al polímero. El Eudragit E100 (Eu) es un polímero catiónico preparado por copolimerización de metacrilato de butilo, metacrilato de 2-dimetilaminoetilo y metacrilato de metilo con una relación molar de 1:2:1 (ver figura 2) [5]. Su peso molecular es de 47.000g/mol y es ampliamente utilizado en formulaciones tópicas y orales, donde generalmente se considera no tóxico, no irritante, y esencialmente seguro en humanos [6]. La formación de este tipo de complejos generan cambios en propiedades fisicoquímicas e incluso de actividad y seguridad, que como se mencionó pueden ofrecer ventajas frente a las propiedades de las moléculas precursoras. La evaluación de la seguridad de moléculas y productos de aplicación tópica y en este caso de los complejos, puede ser valorada por medio de ensayos *in vitro* en celdas de Franz, considerado como uno de los principales métodos para determinar la penetración transepitelial [7].

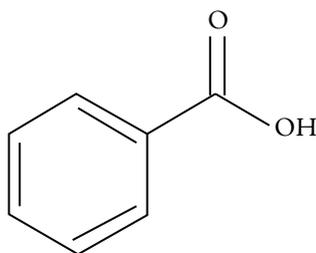


Figura 1. Estructura química del ácido benzoico [5]. Peso molecular: 122,13g, pKa: 4,19, solubilidad en agua: 0,29 g en 100 ml.

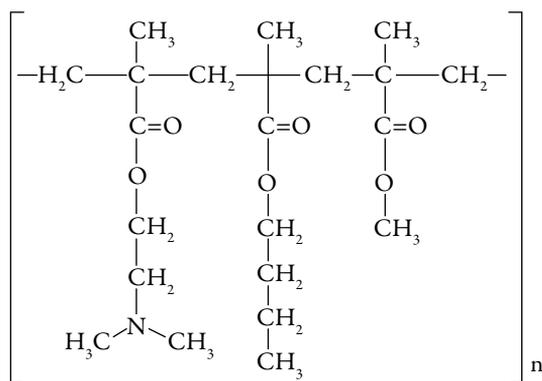


Figura 2. Estructura química del PE Eudragit® E100 [7].

Las celdas de Franz tienen dos compartimentos separados por una membrana sintética o natural (piel), uno donador y otro receptor en el que se muestrea periódicamente para evaluar la cantidad de compuesto que ha penetrado a través del tejido en el tiempo [8]. La estructura de la piel difiere de una especie a otra, sin embargo, el reemplazo de la piel humana por piel animal es aceptable para estos estudios, ya que esta última se encuentra sujeta a consideraciones éticas nacionales e internacionales y no siempre es accesible [8]. La piel de cerdo es apropiada como reemplazo de la piel humana debido a similitudes morfológicas y funcionales, demostrando una correlación eficiente (r) de 0,88 ($p < 0,0001$) como sustituto en los estudios de penetración *in vitro*, siendo la oreja de cerdo una de las partes más apropiadas como reemplazo al presentar espesores similares en las capas de la piel [9].

Se pueden preparar membranas de diferente espesor para experimentos *in vitro*, sin embargo, para cortes efectuados con dermatomo son utilizados valores entre 400-700 μm [10]. Como medio receptor se emplean soluciones salinas ajustadas a pH 7,4; simulando las condiciones del fluido biológico en términos de pH y fuerza iónica, debido a la temperatura superficial de la piel el medio receptor se debe mantener a 32 °C y, también, se debe garantizar que la cantidad máxima de la sustancia no exceda entre el 10 % y 20 % del valor de su solubilidad total en el medio (condiciones sink) [11].

Las metodologías analíticas, empleadas para la cuantificación de moléculas en estudios con muestras biológicas, pueden influir en la evaluación e interpretación de los datos obtenidos, por ello es esencial emplear métodos analíticos bien caracterizados y validados para obtener resultados fiables que se puede interpretar adecuadamente. En la literatura se han reportado diferentes metodologías analíticas para la determinación del ácido benzoico en productos farmacéuticos y muestras biológicas [14, 15], sin embargo, a la fecha no existe una metodología específica para evaluar este compuesto, que se encuentra complejado y que entra en contacto con piel porcina.

Considerando lo anterior, en este trabajo se realizó la validación de una metodología analítica por HPLC–DAD para la cuantificación de ácido benzoico a partir de complejos polielectrolíticos, con el propósito de obtener resultados confiables y apropiados para la interpretación adecuada del perfil de permeación y seguridad del ácido benzoico incluido en los respectivos complejos ($EuB_{75}Cl_{25}$ y EuB_{100}).

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales

Ácido benzoico (99%) Sigma Aldrich (E.U, lote: 09128 DCV); acetonitrilo grado HPLC Tedia (E.U, lote: 905154); ácido fosfórico (85%) Carlo Erba (E.U, lote:

8C109098E); cloruro de sodio J.T Baker (E.U., lote: t10c54); ácido clorhídrico 2,39 M; Eudragit® E100 (Alemania, lote: B140101519); complejo $EuB_{75}Cl_{25}$; complejo EuB_{100} ; agua grado HPLC.

Equipos y condiciones analíticas

Para la realización de los ensayos de permeación se utilizaron celdas de Franz estáticas marca PermeGear® (E.U.) con área de difusión promedio de $1,75 \pm 0,02 \text{ cm}^2$ y 7 mL de volumen, baño termostático Lauda® (E.U.), plancha de agitación multipunto IKA® modelo RO 10 PS1 Werke (Alemania), dermatomo Aesculap-B.Braun modelo ACCULAN® 3Ti, calibrador digital Thomas Scientific® modelo 1235C55, tewametro Courage+Khazaka® modelo TM 300 (Alemania), potenciómetro Hanna® referencia HI 2221 (E.U.), ultrasonido Cole-Parmer® modelo 8891 (E.U.), sistema de purificación de agua Direct-Q® (E.U.), equipo de filtración al vacío, balanza analítica (sensibilidad de 0,001 g y 0,0001g) marca Ohaus® serie Pioneer (E.U.), micropipetas (10-100 μL y 100-1000 μL) marca Select BioProducts® (E.U.); filtros Millex (Millipore Corporation, E.U.) de 0,45 μm . La cuantificación del ácido benzoico por HPLC-DAD se realizó en un cromatógrafo Shimadzu® (Kyoto, Japón), serie Prominence de bomba binaria LC-6AD, con detector de arreglo de diodos (DAD) SPD-M20A, horno CTO-20A, desgasificador DGU-20As, procesador de datos *software* LCsolution® versión 1.25, automuestreador SIL20-A, columna Kinetex® C_{18} , de 4,6 x 150 mm y 5 μm de tamaño de partícula, temperatura isocrática de 35 °C, eluyente: ácido fosfórico (1 %)/ acetonitrilo (70:30 v/v), flujo 1 mL/min, volumen de inyección 10 μL y longitud de onda 226 nm.

Material biológico

Para el desarrollo de los ensayos de permeación se empleó piel de orejas obtenidas de cerdos recién sacrificados de peso entre 80-100 kg y con edad promedio de 4-6 meses procedentes del Frigorífico Guadalupe S.A.S (EFEGE), estas fueron retiradas y almacenadas inmediatamente en solución de NaCl 1M [12] bajo condiciones de refrigeración (4-8 °C). Una vez transportadas, se verificó que la piel no presentara ningún tipo de lesión, mancha o tatuaje, realizando cortes de piel de espesor de 600 μm a las muestras con criterios de aceptación adecuados. Finalmente, se determinó la integridad de la piel a través de la medición de pérdida de agua transepidermal (TEWL), seleccionando pieles porcinas con valores inferiores a 35 g/h/m². Todos los experimentos fueron realizados siguiendo las consideraciones éticas en cuanto a la investigación biomédica con animales y con el aval del Comité de Ética de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional de Colombia (Acta N° 07 de 2015).

Preparación de soluciones de trabajo

Para la validación del sistema y del método se prepararon soluciones madre de ácido benzoico (SM-AB) de 125 $\mu\text{g/mL}$, realizando las diluciones correspondientes para

obtener un rango entre 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de la curva de calibración. Con relación a la validación del método se empleó como medio de disolución NaCl 0,9% ajustado a pH 7,4; el cual permaneció en contacto con los cortes de piel de oreja durante 24 horas a 32 °C simulando las condiciones del ensayo de permeación.

Idoneidad del sistema

Para establecer la idoneidad del sistema cromatográfico se preparó una solución de ácido benzoico de concentración 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ la cual se inyectó 10 veces al cromatógrafo. Se determinaron los siguientes parámetros: factor de asimetría, número de platos teóricos, factor de capacidad y precisión de la inyección.

Validación de la metodología analítica

Con el fin de garantizar que las características de desempeño del método son adecuadas y confiables para la cuantificación del ácido benzoico, en los complejos durante los ensayos de permeación [13], se realizó la validación de la metodología con base en las directrices establecidas por la conferencia Internacional de armonización (ICH) guía Q2 (R1), así como los lineamientos de la *Guía para la industria de validación de métodos bioanalíticos de la FDA* [14].

Especificidad

Para la evaluación de la especificidad se analizaron los componentes de la fase móvil (ácido fosfórico al 1% y acetonitrilo), medio de almacenamiento para las orejas de cerdo (NaCl 1M), EudragitE® 100, ácido clorhídrico 2,39M, 10 muestras de blanco de matriz obtenidas de los ensayos de permeación cuyo montaje se realizó con 10 pieles de oreja porcina de diferente procedencia en las celdas de Franz a 32 °C, empleando NaCl 0,9% ajustado a pH 5 en el compartimento donador y pH 7,4 en el compartimento receptor. Después de 24 horas de duración del ensayo se tomaron alícuotas de 500 μL del compartimento receptor y se analizaron, estableciendo como variables de especificidad a evaluar: el tiempo de retención (t_r) del ácido benzoico con una ventana de detección menor al 3%, los espectros de absorción molecular (EAM) y la pureza espectral del pico.

Linealidad

Partiendo de tres SM-AB se prepararon soluciones por triplicado de concentraciones: 2, 4, 6, 8, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ tanto para el sistema como para el método. El análisis respectivo de la pendiente e intercepto se realizó por medio del estadístico t de Student y la regresión fue evaluada a través del análisis de varianza (ANOVA). Como criterio de aceptación para el estadístico t asumiendo 13 grados de libertad (GL) se tuvo en cuenta un t crítico de 2,1604, y en el caso del ANOVA un F crítico de 4,667 con GL en el numerador de 1 y en el denominador de 13. Tanto para el estadístico t como para el ANOVA la probabilidad seleccionada fue del 95%.

Precisión

La evaluación de la precisión fue llevada a cabo a tres niveles de concentración (2, 6, 10 $\mu\text{g/mL}$) para el sistema y método. En el caso de repetibilidad (niveles intradía) se prepararon por triplicado cada uno de los niveles de concentración, con el mismo analista, equipo y día. Para la precisión intermedia (niveles interdía) se prepararon por triplicado cada uno de los niveles de concentración, con dos analistas y en tres días diferentes. La repetibilidad se reporta en términos del coeficiente de variación promedio ponderado (RSDp), teniendo como criterio de aceptación un $\text{RSDp} \leq 5\%$ para el sistema y $\leq 15\%$ para el método [14, 15]. Adicionalmente, se evaluó a través del RSDp empleando el test de Cochran con un G crítico de 0,8709, asumiendo k y $n = 3$ y nivel de confianza del 95%. En el caso de la precisión intermedia se evaluó mediante un análisis de varianza (ANOVA), asumiendo un nivel de confianza del 95%, un F crítico de 4,1034 con GL en el numerador de 1 y en el denominador de 48, para el factor analista y un F crítico de 3,183 con GL en el numerador de 2 y en el denominador de 48, para los factores día y réplica.

Exactitud

Se prepararon por triplicado soluciones de concentración 2, 6, 10 $\mu\text{g/mL}$. Derivado de los estudios de linealidad se calculó el porcentaje de recuperación; la exactitud debe encontrarse entre 98 % y 102 %. Adicionalmente, se realizó el análisis correspondiente por medio del estadístico t Student, asumiendo un nivel de confianza del 95%.

Límites de detección y cuantificación

Para la determinación de los límites de detección (LOD) y cuantificación (LOQ) se prepararon 10 curvas de calibración del método y sistema en el rango de 2 a 10 $\mu\text{g/mL}$.

El límite de detección (ver ecuación 1) y el límite de cuantificación (ver ecuación 2) fueron calculados con base en la desviación estándar de los interceptos de las líneas de regresión (S_a) y de la pendiente (b) de la curva de calibración del método y sistema respectivamente.

Ecuación 1: límite de detección [13]

$$LOD = \frac{3b}{S_a}$$

Ecuación 2: límite de cuantificación [13].

$$LOQ = \frac{10b}{S_a}$$

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el análisis cromatográfico para comprobar la idoneidad del sistema se consideraron los siguientes parámetros: factor de asimetría, número de platos teóricos, factor de capacidad y precisión en la inyección (% RSD); de acuerdo con la tabla 1 es posible

afirmar que el sistema cumple con los criterios de aceptación y por lo tanto es adecuado para el análisis requerido. Ni la selectividad, ni la resolución fueron factores considerados pues estos parámetros se relacionan con la posición y separación de dos o más compuestos en una mezcla, debido a que las muestras a evaluar no son mezclas y en el cromatograma solo se evidencia un compuesto (ácido benzoico), la determinación de estos no se estableció [16].

Tabla 1. Parámetros idoneidad del sistema cromatográfico.

Parámetro	Valor	Criterio de aceptación
Factor de asimetría	1,22	<2
Número de platos teóricos	10512	>2000
Factor de capacidad	1,7	<1,9
Precisión de la inyección (RSD)	0,2%	<2%

El ácido benzoico presentó un tiempo de retención de $3,84 \pm 0,02$ min siendo apropiado para la realización de análisis rápidos y de bajo costo sin interferir con la señal de la matriz. Por medio del espectro de absorción molecular (ver figura 3) de una muestra del estándar del ácido benzoico a $6 \mu\text{g/mL}$ se determinó que la longitud de onda de máxima absorción (λ_{max}) era de 226 nm, utilizándose este valor para la realización del análisis de las muestras.

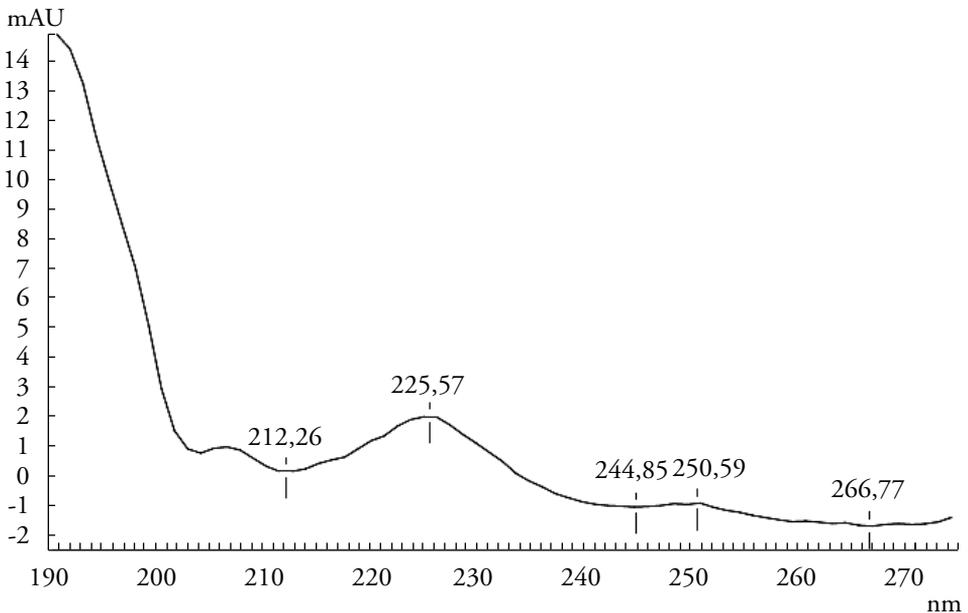


Figura 3. EAM Ácido benzoico. Procesado con el *software* LCsolution.

Por medio de la comparación de los tiempos de retención de los cromatogramas obtenidos de las muestras de los componentes de la fase móvil (ácido fosfórico al 1% y acetonitrilo), medio de almacenamiento para las orejas de cerdo (NaCl 1M), componentes de los complejos $EuB_{75}Cl_{25}$ y EuB_{100} (EudragitE® 100 y ácido clorhídrico 2,39 M) y de los blancos de matriz de piel porcina sin ácido benzoico, se determinó que no se presentaban interferentes en el tiempo de retención del ácido benzoico, puesto que no se identificó ninguna señal adicional como se observa en la figura 4. Adicionalmente, se verificó que ninguna de las muestras modificaba el EAM y la curva de similitud no se cruzara con la línea umbral, como es lo esperado. Esto indica que tras la comparación del espectro medio del pico con el resto de espectros, a medida que eluye el analito, no se presentan interferentes ya que la relación entre los mismos es 1 (índice de pureza de pico), como puede verse en la figura 5. Por lo tanto, la metodología analítica empleada garantiza la obtención de una señal inequívoca y específica del analito sin ningún interferente.

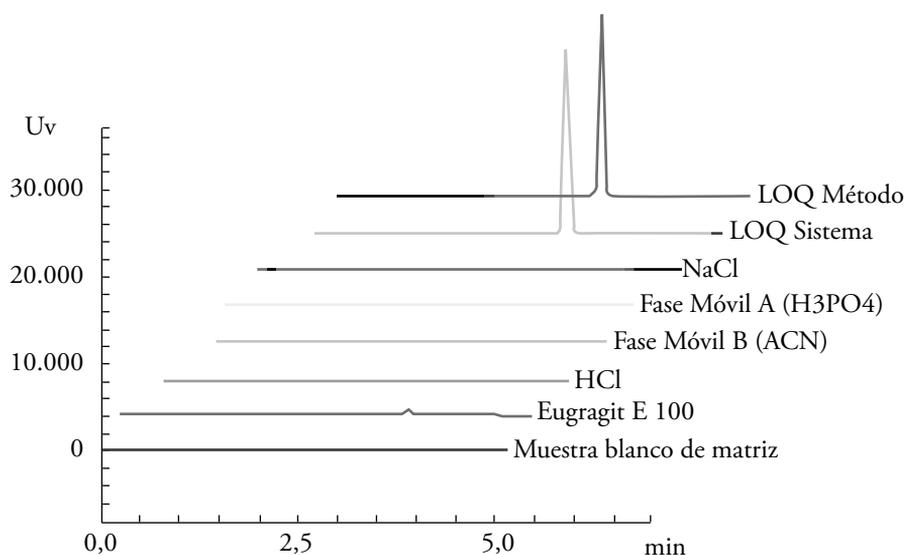
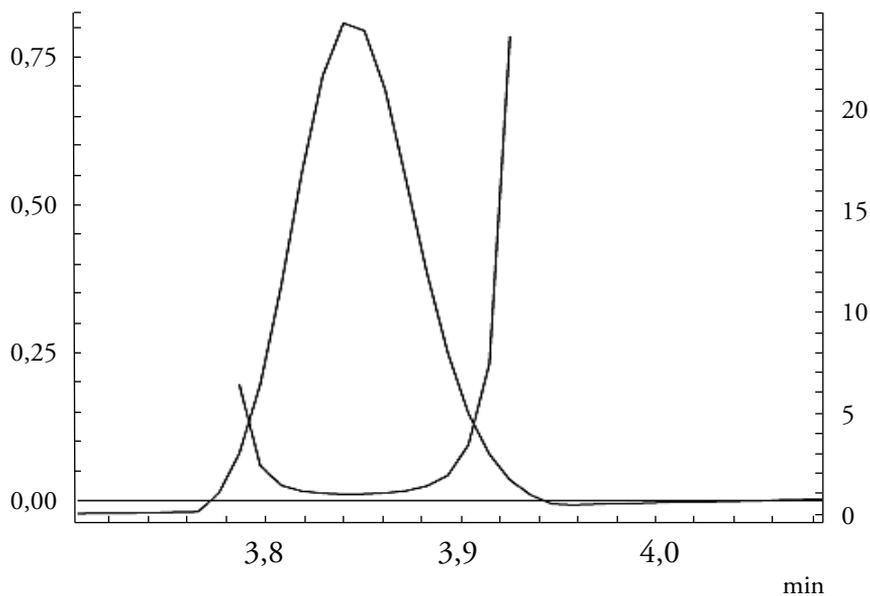


Figura 4. Cromatogramas de la evaluación de especificidad. Datos procesados con el *software* LCsolution®.

Por otro lado, en la figura 6 se observan las curvas de calibración para el rango de concentraciones del ácido benzoico para el sistema y método. El rango de concentraciones se seleccionó considerando la ley de Lambert y Beer que establece, con base en el coeficiente de absorptividad, el rango de concentraciones en el cual se espera que la curva de calibración sea lineal [17]; de esta manera se empleó la mínima concentración posible para cuantificar pequeñas cantidades de ácido benzoico en los ensayos de absorción.



Impurity :Not Detected
 Peak purity index : 1.000000
 Single point threshold : 0.989150
 Minimum peak purity index : 10849

Figura 5. Pureza de pico ácido benzoico. Procesado con el *software* LCsolution®.

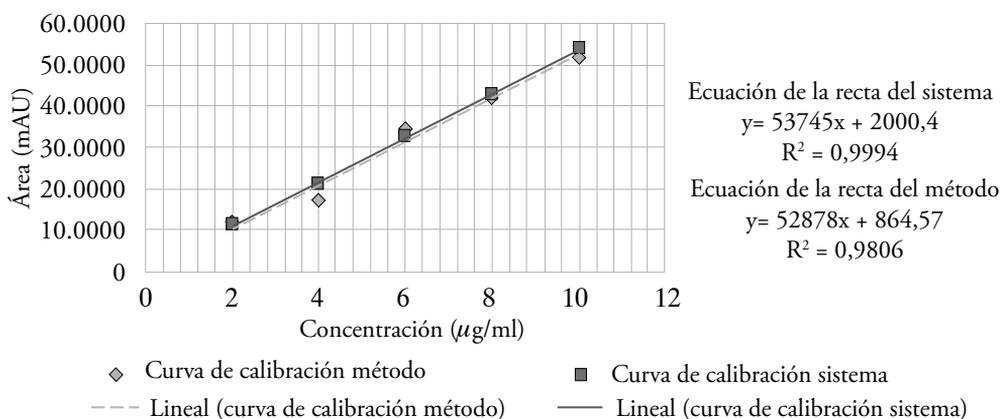


Figura 6. Curvas de calibración ácido benzoico (método y sistema).

Para evaluar el intercepto, la pendiente y el coeficiente de correlación de las curvas de calibración del sistema y método se plantearon pruebas de hipótesis las cuales fueron analizadas por medio del estadístico t Student (ver tabla 2).

Tabla 2. Análisis estadístico t Student para el intercepto, pendiente y coeficiente de correlación de las curvas de calibración del sistema y método.

	<i>Parámetro</i>	<i>Ho</i>	<i>t estimado</i>	<i>t tabla</i>	<i>Criterio</i>	<i>Resultado</i>
<i>Sistema</i>	<i>Intercepto</i>	$a = 0$	0,15	2,1604	$t_{est} > t_{tab}$. Se rechaza H_0	<i>No se rechaza H_0</i>
	<i>Pendiente</i>	$b = 0$	27,23	2,1604		<i>Se rechaza H_0</i>
	<i>Correlación</i>	<i>No hay correlación entre x-y</i>	24,546	2,1604		<i>Se rechaza H_0</i>
<i>Método</i>	<i>Intercepto</i>	$a=0$	-0,03	2,1604	$t_{est} > t_{tab}$. Se rechaza H_0	<i>No se rechaza H_0</i>
	<i>Pendiente</i>	$b=0$	12,28	2,1604		<i>Se rechaza H_0</i>
	<i>Correlación</i>	<i>No hay correlación entre x-y</i>	11,07	2,1604		<i>Se rechaza H_0</i>

De acuerdo con los datos obtenidos, se observa que con relación al intercepto se presenta un t estimado para el sistema y método menor al t tabulado, por lo que no se rechaza la hipótesis nula y en consecuencia se puede afirmar que el intercepto con el eje Y no es significativamente diferente de cero. Respecto a las pendientes y coeficientes de correlación para el sistema y método, el t estimado es mayor al t tabulado, por tanto no se acepta la hipótesis nula, obteniendo como resultado que las pendientes son significativamente diferentes de cero y que existe una correlación significativa entre los valores de la concentración de ácido benzoico (eje X) y las áreas obtenidas de los picos de absorción para las concentraciones dadas (eje Y).

Adicionalmente, para evaluar la regresión y la dispersión de los datos entre las réplicas para los diferentes niveles de concentración analizados se empleó el ANOVA y estadístico de Fisher (F) (ver tabla 3). Respecto a la regresión el $F_{estimado} > F_{tabulado}$, por lo tanto, la hipótesis nula (H_0) “la regresión no es significativa” se rechaza, demostrando que la regresión es significativa para el sistema y método. De manera análoga, estadísticamente no hay un desvío significativo de la linealidad ya que el $F_{estimado} < F_{tabulado}$, por lo tanto la H_0 , “el desvío no es significativo”, se acepta.

Considerando los resultados obtenidos en los test realizados, y con base en los parámetros evaluados, es posible afirmar que la metodología analítica garantiza la linealidad del método y del sistema en el rango de concentraciones establecidas.

Tabla 3. Análisis de varianza (ANOVA) y estadístico de Fisher para determinar la regresión y desvío significativo de las curvas de calibración del sistema y método.

	Parámetro	Grados de libertad (gl)	Suma de cuadrados (SC)	Cuadrado medio (CM)	Fo	Ft
Sistema	Regresión	1	3,466 E+11	4,466E+12	741,5	4,66
	Falta de ajuste	3	196749856,9	65583285,6	0,111	3,25
	Error residual	13	6076536592	467425891,7		
	Error puro	10	5879786735	587978673,5		
	Error total	14	3,527E+11			
Método	Regresión	1	3,355 E+11	3,355E+12	150,8	4,66
	Falta de ajuste	3	6645712995	2215237665	0,995	3,25
	Error residual	13	28916432490	2224340961		
	Error puro	10	22270719495	2227071949		
	Error total	14	3,644E+11			

Como se indicó anteriormente, la repetibilidad (precisión intradía) fue evaluada a través del Test de Cochran (estadístico G); en la tabla 4 se observa que el $G_{exp} < G_{tab}$ por lo que no hay diferencia significativa entre las varianzas de los niveles de concentración evaluados. De manera complementaria, los RSDp para la curva de calibración del sistema y del método son $\leq 5\%$ y $\leq 15\%$, respectivamente, cumpliendo con las especificaciones establecidas [14, 15].

Tabla 4. Test de Cochran para evaluación de repetibilidad (precisión intradía) en las curvas de calibración del sistema y método.

Concentración ($\mu\text{g/ml}$)	Sistema			Concentración ($\mu\text{g/ml}$)	Método		
	2	4	6		2	4	6
X	111504	313384	533256	X	116216,3	343415	515636
S	183337	2345222	1120426	S	108854444	1019529442	5779349044
C.V (%)	0,384	0,489	0,198	C.V (%)	14,5	9,298	14,7

(Continúa)

Tabla 4. Test de Cochran para evaluación de repetibilidad (precisión intradía) en las curvas de calibración del sistema y método. (Continuación)

Sistema				Método			
Concentración (µg/ml)	2	4	6	Concentración (µg/ml)	2	4	6
RSDp	0,377			RSDp	13,1		
G_{exp}	0,643			G_{exp}	0,816		
G_{tab}	0,8709			G_{tab}	0,8709		
Ho	No hay diferencia significativa entre varianzas			Ho	No hay diferencia significativa entre varianzas		
Criterio	G _{exp} > G _{tab} , se rechaza Ho			Criterio	G _{exp} > G _{tab} , se rechaza Ho		

La evaluación de la precisión intermedia (interdía) se determinó a través del ANOVA a tres niveles de concentración (2, 6, 10 µg/mL). Empleando el estadístico F se evidencia que para el sistema y el método el F estimado es menor al F tabulado (ver tabla 5), en todas las fuentes de variación esperadas (analista, día y réplicas), por lo que no existe variación significativa en los resultados obtenidos con analistas y días diferentes.

Tabla 5. Análisis de varianza (ANOVA) y estadístico de Fisher para determinar la precisión intermedia en las curvas de calibración del sistema y método.

	Fuente de variación	Grados de libertad (gl)	Suma de cuadrados (SC)	Cuadro medio (CM)	F _o	F _t
Sistema	Analista	1	314466987,9	314466987,9	0,009006883	4,04 (1, 48, 0,05)
	Días	2	1261825396	630912698	0,018070439	3,19 (2, 48, 0,05)
	Réplicas	2	443368645,3	221684322,7	0,006349425	3,19 (2, 48, 0,05)
	Error	48	1,67588E+12	34914076538		
	Total	53	1,6779E+12			
Método	Analista	1	1748946738	1748946738	0,048226918	4,04 (1, 48, 0,05)
	Días	2	919936125,4	459968062,7	0,012683543	3,19 (2, 48, 0,05)
	Réplicas	2	1061681011	530840505,4	0,014637839	3,19 (2, 48, 0,05)
	Error	48	1,74072E+12	36264949533		
	Total	53	1,74445E+12			

Los resultados obtenidos permiten establecer que la metodología analítica es precisa para los diferentes niveles analizados (repetibilidad y precisión intermedia).

Considerando la ecuación de la curva de calibración del sistema, se determinó que el porcentaje de recuperación de la metodología analítica es 98,7%, por lo tanto, cumple con los criterios de aceptación requeridos para la exactitud.

Adicionalmente, el análisis realizado con el estadístico t de Student (ver tabla 6) evidencia que el t estimado < t tabulado, lo cual conlleva a aceptar la Ho y concluir que el porcentaje de recuperación no es significativamente diferente de 100, por lo tanto, la metodología analítica es exacta para la cuantificación del ácido benzoico en la matriz biológica empleada.

Tabla 6. Análisis estadístico t Student para la evaluación de la exactitud de la metodología analítica empleada.

Variable		Ho	Criterio	t exp	t tab	Resultado
%R _{promedio}	98,74433369	%R no es diferente de 100%	t exp > t tab Se rechaza Ho	0,286021528	2,306	No se rechaza Ho
S ²	169,1289369					
C.V	13,17033361					

El límite de cuantificación (LOQ) fue de 0,72 y 1,56 µg/mL para el sistema y método respectivamente, el valor del límite de detección (LOD) para el sistema fue de 0,23 µg/mL y de 0,51 µg/mL para el método, por lo que todos los niveles de concentración de la curva de calibración del sistema y método pueden ser cuantificados con exactitud y precisión (ver tabla 7).

Tabla 7. Pendiente y desviación estándar de las curvas de calibración del sistema y método para el cálculo de los límites de cuantificación y límites de detección.

	Pendiente de curva de calibración y desviación estándar		LOQ	LOD
Sistema	Sa	53745	0,72 µg/mL	0,23 µg/mL
	b	3784,31501		
Método	Sa	52878	1,56 µg/mL	0,51 µg/mL
	b	8263		

La metodología analítica validada permitió determinar el flujo y el coeficiente de permeación del ácido benzoico, evaluados a través de piel de cerdo en condiciones de dosis

infinitas, empleando las celdas de Franz. De manera similar, fue posible cuantificar al ácido benzoico, sólo y complejado, en concentraciones normales de uso (dosis finita), para evaluar si los complejos ofrecen ventaja en términos de seguridad frente al ácido benzoico. Las concentraciones estudiadas estuvieron comprendidas en el rango de concentraciones evaluadas a lo largo de la validación, siendo posible cuantificarlo con precisión, exactitud y especificidad en valores comprendidos alrededor del límite de cuantificación.

CONCLUSIONES

Se implementó una metodología analítica por HPLC-DAD para evaluar la permeación *in vitro* de ácido benzoico a partir de complejos polielectrolíticos a través de piel porcina. Dicha metodología resultó específica, lineal en el rango de concentraciones de 2 a 10 µg/mL, precisa (RSDp ≤ 5 % y ≤ 15% para el sistema y método), exacta con un porcentaje de recuperación de 98,7%, con LOD de 0,23 µg/mL (sistema) y de 0,51 µg/mL (método) y con LOQ de 0,72 y de 1,56 µg/mL para el sistema y método respectivamente.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a COLCIENCIAS por la financiación otorgada al proyecto de investigación que apoyó este trabajo de investigación-Contrato 037-2016.

CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaran no tener conflicto de intereses.

REFERENCIAS

1. H. Dao, P. Lakhani, A. Police, Microbial stability of pharmaceutical and cosmetic products, *AAPS PharmSciTech*, **18**, 19 (2017).
2. T. Sandle. "Antibiotics and preservatives Pharm. Microbiol. Essentials Qual. Assur. Qual. Control" 1st Ed., Cambridge: Elsevier Ltd., Cambridge, 2015, p. 171-83.
3. A. Olmo, J. Calzada, M. Nuñez, Benzoic acid and its derivatives as naturally occurring compounds in foods and as additives: uses, exposure and controversy, *Crit. Rev. Food Sci. Nutrition*, **57**, 3084 (2015).

4. D. Le Cerf, A.S. Pepin, Formation of polyelectrolyte complexes with diethylaminoethyl dextran: Charge ratio and molar mass effect, *Carbohydr. Polym.*, **113**, 217 (2014).
5. R.I. Moustafine, V.A. Kemenova, Characteristics of interpolyelectrolyte complexes of Eudragit E 100 with sodium alginate, *Int. J. Pharm.*, **294**, 113 (2015).
6. M. Guzmán, R. Manzo, M. Olivera, Eudragit E100 as a drug carrier: The remarkable affinity of phosphate ester for dimethylamine, *Mol. Pharmaceutics*, **9**, 2424 (2012).
7. Y. Baena, L.J. Dallos, R. Manzo, L.F. Ponce D'León, Estandarización de celdas de Franz para la realización de ensayos de liberación de fármacos a partir de complejos con polielectrolitos, *Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm.*, **40**, 174 (2011).
8. A. Simona, M. Amarob, A. Healy, Comparative evaluation of rivastigmine permeation from a transdermal system in the Franz cell using synthetic membranes and pig ear skin with *in vivo-in vitro* correlation, *Int. J. Pharm.*, **512**, 234 (2016).
9. V.P. Shah, H.I. Maibach, J. Jenner, "Topical Drug Bioavailability, Bioequivalence, and Penetration", Springer Ed., New York, 2014, Vol. 1, p. 23-24.
10. C. Ehrhardt, K. Kim, "Drug Absorption Studies *In Situ*, *In Vitro* and *In Silico* Models", Springer Ed., New York, 2008, Vol. 7, p. 14.
11. L. Aponte, "Estudios de permeación transdérmica in vitro: estado del arte y perspectivas", trabajo de grado, Universidad Nacional de Colombia, 2015, p. 15.
12. N. Solarte, "Estudio de las condiciones para la evaluación de permeación transdérmica de un ingrediente funcional cosmético in vitro empleando piel de cerdo en celdas de Franz", trabajo de grado, Universidad Nacional de Colombia, 2013, p. 7-19.
13. 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 Agosto de 2017
14. US Food and Drug Administration, Guidance for Industry, Bioanalytical Method Validation, Center for Drug Evaluation and Research, September 2013. URL: <https://www.fda.gov/downloads/Drugs/Guidances/ucm368107.pdf>. Consultado en Julio de 2017.

15. L. Aguirre, F. García, T. Junca, *et al.*, “Validación de Métodos Analíticos”, AEFI, Barcelona, 2001.
16. USP 30-NF 25, Farmacopea de los Estados Unidos de América, 2007, Vol. 3.
17. W. Mäntele, E. Deniz, UV–VIS absorption spectroscopy: Lambert-Beer reloaded, *Spectrochim. Acta Part A: Mol. Biomol. Spectrosc.*, **173**, 965 (2017).

CÓMO CITAR ESTE ARTÍCULO

L.A. Martínez, J.A. Martínez, Y. Baena, Validación de una metodología analítica por HPLC-DAD para la cuantificación de ácido benzoico complejoado, en un ensayo de permeación transdérmica *in vitro* empleando piel de cerdo, *Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm.*, **47**(3), 424-440 (2018).

A descrição matemática do desempenho do novo derivado acridínico na detecção eletroanalítica do conteúdo total do ácido gálico em alfarroba

Volodymyr V. Tkach^{*1,2}, Marta V. Kushnir¹, Yana G. Ivanushko¹, Sílvio C. de Oliveira², Mykhailo P. Zavorodnii³, Oleksandr A. Brazhko³, Olga V. Luganska³, Oleksandra V. Ahafonova⁴, Petró I. Yagodynets¹

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

* Correio eletrônico: nightwatcher2401@gmail.com.

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

³ Universidade Nacional de Zaporizhzhya, Faculdade de Biologia, 69095, Rua de Zhukovs 'ky. 66, Zaporizhzhya, Ucrânia.

⁴ Universidade Estatal de Medicina de Bucovina, 58000, Praça Teatral, 9, Chernivtsi, Ucrânia.

Recebido em: 25 de janeiro de 2018

Aceito em: 4 de outubro de 2018

RESUMO

A possibilidade do uso de um novo derivado de acridina, munido de um grupo doador de elétrons, como modificador de elétrons para a detecção do conteúdo total do ácido gálico em goma de alfarroba tem sido avaliada mediante uma análise teórica. O modelo matemático correspondente foi analisado mediante a teoria de estabilidade linear e análise de bifurcações. Foi mostrado que o derivado fosfazoico da acridina pode servir de modificador eficiente para a detecção eletroanalítica do conteúdo total do ácido gálico em alfarroba. As causas dos comportamentos oscilatório e monotônico também foram detectadas.

Palavras-chave: Alfarroba, ácido gálico, eléctrodos quimicamente modificados, sensores eletroquímicos, estado estacionário estável.

SUMMARY

The mathematical description of the function of a novel acridinic derivative in the electroanalytical detection of total gallic acid content in carob

The possibility of the use of the novel acridinic derivative, containing an electron donor moiety in the total gallic acid content determination in carob gum has been evaluated by means of a theoretical analysis. The correspondent mathematical model has been analyzed by linear stability theory and bifurcation analysis. It was shown that the phosphazoic acridine derivative may serve as an efficient electrode modifier for electroanalytical determination of the total content of gallic acid in carob. The causes for the oscillatory and monotonic behavior have also been stipulated.

Key words: Carob, gallic acid, chemically modified electrodes, electrochemical sensors, stable steady-state.

INTRODUÇÃO

A alfarrobeira (*Ceratonia siliqua*), também conhecida como pão-de-São-João, figueira-de-Pitágoras ou figueira-do-Egito, é uma planta nativa da região mediterrânica (incluindo Espanha e Portugal), cuja fruta é alfarroba. A alfarrobeira sói utilizar-se na produção de alimentos e bebidas [1-2] e na medicina popular.

Além dos polissacarídeos, que compõem a sua goma (E410), a alfarroba contém outros compostos, dentre os quais se destacam a tanina e outros ésteres do ácido gálico (ver figura 1) [3-4]. São compostos com alto poder antioxidante, haja vista a presença dos fragmentos quinônicos nas suas formas oxidadas, permitindo o seu uso como conservante na produção tanto de alimentos, como de fármacos e até de biodiesel. No entanto, quando em excesso, estes ésteres podem causar reações alérgicas, associadas ao ácido gálico (dores nas costas, hiperatividade, nariz entupido, dificuldades na aprendizagem) [5]. Outrossim, estes ésteres não são recomendados em produtos, que requerem emprego de forno [6]. Foi provada, ademais, a sua capacidade antagonista aos estrogênios [7]. Destarte, o desenvolvimento dos métodos da detecção analítica destes compostos é, deveras, uma tarefa atual [8-9], e os métodos eletroquímicos, envolvendo eletrodos quimicamente modificados, ser-lhe-iam uma resposta interessante.

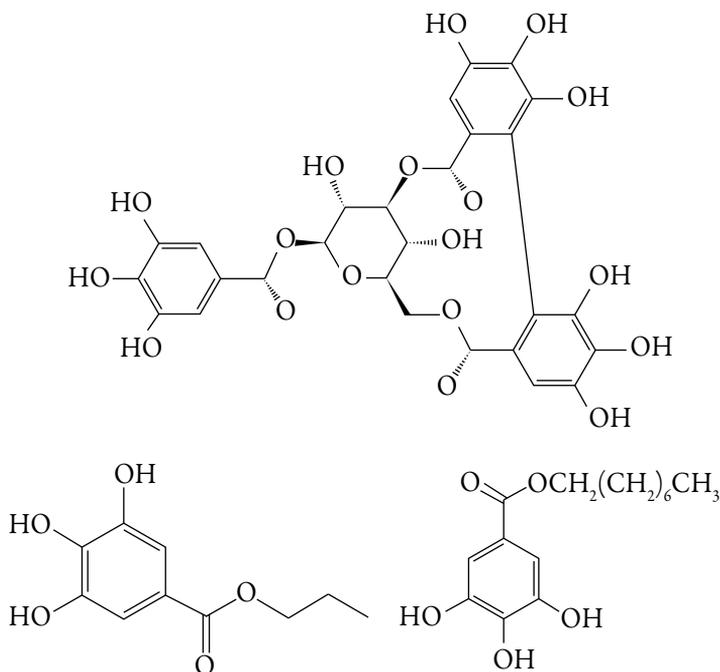


Figura 1. Os derivados importantes do ácido gálico. Galotanina, galato de propila (E310) e galato de octila (E311).

Para a detecção eletroquímica dos ésteres do ácido gálico e outros compostos quinônicos foram utilizadas várias metodologias eletroquímicas, envolvendo os materiais modificadores como líquidos iônicos [10], polímeros condutores [11], éster específico do ácido molibdênico [12] e até a casca de banana [13]. No entanto, existe, também, a possibilidade de uso de outros tipos de modificadores, como o oxihidróxido de cobalto (teoricamente previsto em [14]) e, também, os novos derivados orgânicos.

Em [15], foi descrita a síntese de um novo derivado orgânico, com possibilidades para ser aditivo fluorescente ao polímero condutor ou monômero para uso eletroanalítico e conversor em pilhas solares. Contendo um sistema conjugado, substituído por um doador forte de elétrons pi, ele pode ser eletroquimicamente ativo. No entretanto, o uso de novos modificadores e processos eletroanalíticos pode acarretar a resolução de novos problemas, como:

- A indecisão acerca do mecanismo de interação entre o modificador e o analito.
- A possível incompatibilidade do modificador do eletrodo para análise *in vivo*.

- A possibilidade da realização das instabilidades eletroquímicas, características para a eletrooxidação dos compostos orgânicos [16-21], inclusive a eletropolimerização de compostos heterocíclicos.

Destarte, o desiderato deste trabalho é a investigação mecanística teórica do desempenho do novo derivado acridínico, cuja síntese foi descrita no nosso trabalho anterior, para a determinação do conteúdo total do ácido gálico em alfarroba. Para alcançá-lo, é-nos preciso realizar os seguintes objetivos específicos:

- Propor o mecanismo do processo eletroanalítico.
- Desenvolver e analisar o modelo matemático, que lhe é correspondente.
- Da análise do modelo, julgar acerca da possibilidade da realização da quantificação eletroquímica do conteúdo do ácido gálico, mediante a aplicação do eletrodo, dopado pelo composto acridínico.
- Comparar o comportamento deste sistema com o dos semelhantes [22-24].

O SISTEMA E O SEU MODELO

A síntese da nova (9-trifenilfosfazo)acridina tem sido descrita em [15] e é apresentada na figura 2:

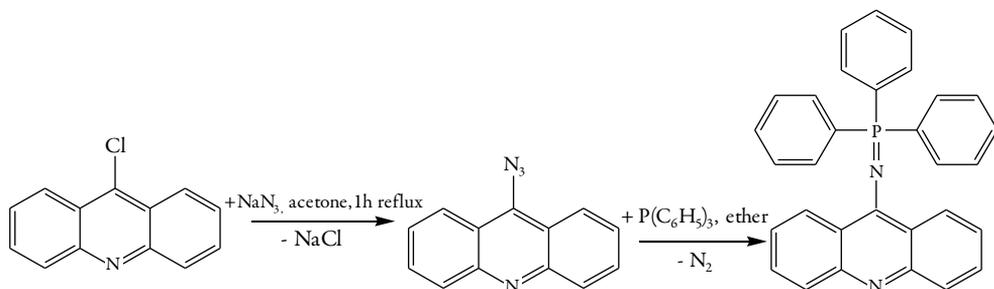


Figura 2. A síntese do novo derivado da acridina.

A presença do grupo trifenilfosfazoico, que consegue doar 20 elétrons pi ao sistema conjugado acridínico, diminui o seu potencial da eletrooxidação, fazendo possível, até a polimerização deste composto, ou a introdução do fragmento dentro de uma cadeia polimérica condutora. Destarte, o mecanismo do processo eletroanalítico para derivados do ácido gálico dar-se-á conforme a figura 3:

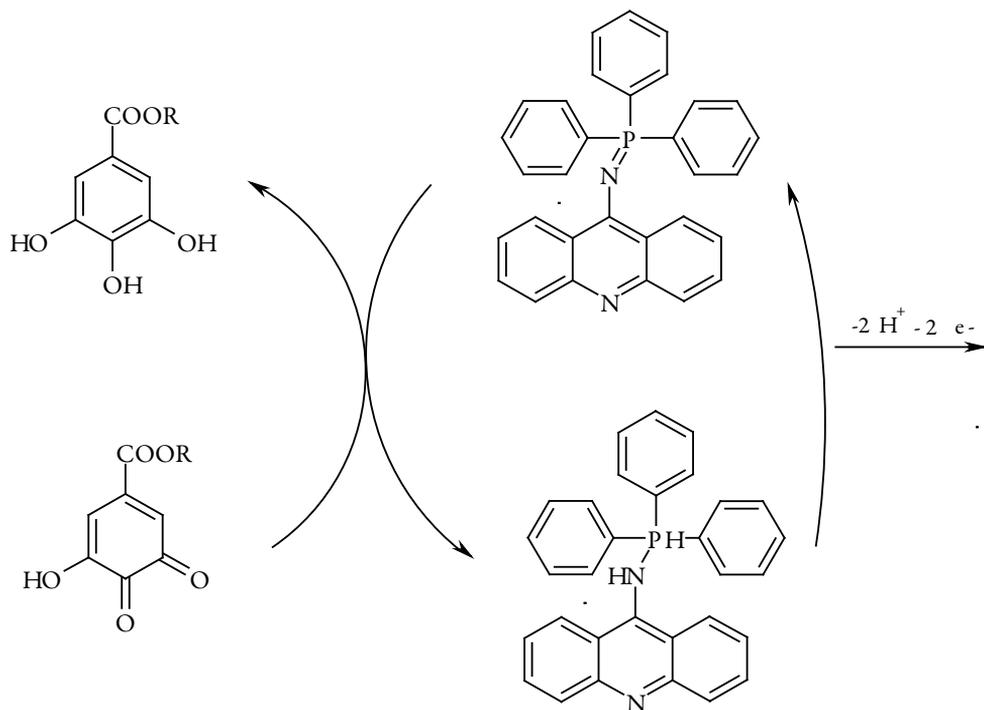


Figura 3. O desempenho eletroanalítico da (9-trifenilfosfazo)acridina.

Tomando em conta a possibilidade da reação lateral do composto fosfazoico com o um composto, presente no meio reacional (podendo ou não dissolver o composto fosfazoico) e incapaz de reagir com o ácido gálico, introduzimos as três variáveis:

g : a concentração do derivado do ácido gálico em meio pré-superficial;

θ : o grau de recobrimento da área do eletrodo pelo derivado fosfazoico inicial;

s : a concentração da substância, capaz de reagir com o modificador do eletrodo, na camada pré-superficial.

Para simplificar a modelagem, supomos que o reator esteja agitando-se intensamente, de modo que possamos menosprezar o fluxo de convecção, que o eletrólito de suporte esteja em excesso, para menosprezar o fluxo de migração. Também supomos que a camada pré-superficial esteja de espessura constante, igual a δ , e que o perfil concentracional dos dois analitos seja linear.

É possível mostrar que, haja vista o supracitado, o comportamento do sistema poder-se-á descrever pelo conjunto de equações diferenciais, representado como:

$$\begin{cases} \frac{dg}{dt} = \frac{2}{\delta} \left(\frac{\Delta}{\delta} (g_0 - g) - r_1 \right) \\ \frac{d\theta}{dt} = \frac{1}{G} (r_2 - r_1 - r_3) \\ \frac{ds}{dt} = \frac{2}{\delta} \left(\frac{D}{\delta} (s_0 - s) - r_3 \right) \end{cases} \quad (1)$$

em que Δ e D são coeficientes de difusão dos derivados do ácido gálico e da substância interferente, g_0 e s_0 são as suas concentrações no interior da solução e os parâmetros r são as velocidades das respectivas reações, que se podem calcular conforme:

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

$$r_2 = k_2 (1 - \theta) \exp \frac{2F\varphi_0}{RT} \quad (3)$$

$$r_3 = k_3 s \theta \exp(-\beta\theta) \quad (4)$$

em que os parâmetros k são constantes das respectivas reações, F é o número de Faraday, φ_0 é o salto do potencial, relativo ao potencial de carga zero, R é a constante universal de gases, T , a temperatura absoluta e β o parâmetro, que descreve a interação entre as partículas do fosfazocomposto da acridina durante a sua dissolução e igual a 0, quando esta não ocorre.

O comportamento do sistema mostra-se parecido aos já descritos em [22-24]. No entanto, a presença de uma reação lateral dinamiza, de maneira significativa, o comportamento do sistema, o que se mostrará abaixo.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para investigar o comportamento do sistema com a detecção eletroquímica do conteúdo total do ácido gálico em alfarroba, assistida pelo derivado fosfazoico da acridina, analisamos o conjunto de equações diferenciais (1) mediante a teoria de estabilidade linear. Os elementos estacionários da matriz funcional de Jacobi descrever-se-ão como:

$$\begin{pmatrix} a_{11} & a_{12} & a_{13} \\ a_{21} & a_{22} & a_{23} \\ a_{31} & a_{32} & a_{33} \end{pmatrix} \quad (5)$$

em que:

$$a_{11} = \frac{2}{\delta} \left(-\frac{\Delta}{\delta} - k_1 \theta \right) \quad (6)$$

$$a_{12} = \frac{2}{\delta} (-k_1 c) \quad (7)$$

$$a_{13} = 0 \quad (8)$$

$$a_{21} = \frac{1}{G} (-k_1 \theta) \quad (9)$$

$$a_{22} = \frac{1}{G} \left(-k_2 \exp \frac{2F\varphi_0}{RT} + jk_2(1-\theta) \exp \frac{2F\varphi_0}{RT} - k_1 c - k_3 s \exp(-\beta\theta) + \beta k_3 s \theta \exp(-\beta\theta) \right) \quad (10)$$

$$a_{23} = \frac{1}{G} (-k_3 \theta \exp(-\beta\theta)) \quad (11)$$

$$a_{31} = 0 \quad (12)$$

$$a_{32} = \frac{2}{\delta} (-k_3 s \exp(-\beta\theta) + \beta k_3 s \theta \exp(-\beta\theta)) \quad (13)$$

$$a_{33} = \frac{2}{\delta} \left(-k_3 \theta \exp(-\beta\theta) - \frac{D}{\delta} \right) \quad (14)$$

Analisando as equações (6), (10) e (14), que representam os elementos da diagonal principal, é possível mostrar que o comportamento oscilatório é possível neste sistema. De qualquer maneira, quando o parâmetro j , que descreve as influências da etapa eletroquímica na capacitância da dupla camada elétrica, tem valores positivos, o adendo $+jk_2(1-\theta) \exp \frac{2F\varphi_0}{RT} > 0$ é positivo, descrevendo, destarte, a positiva conexão de retorno. Assim, ele descreve o comportamento oscilatório, causado por essas influências e característico para os sistemas semelhantes [22-24].

Quanto à influência das instabilidades superficiais, elas só se realizam, havendo dissolução do composto fosfazoico. Assim, $\beta k_3 s \theta \exp(-\beta\theta) > 0$, descrevendo a atração entre as partículas adsorvidas do composto fosfazoico como causa do comportamento oscilatório. Não havendo dissolução, o fator da atração das partículas do composto será desprezível; $\beta=0$, e o elemento supracitado anular-se-á. Destarte, é possível ver que a presença do fator superficial como causa do comportamento oscilatório dependerá da característica da reação lateral.

A fim de investigar a *estabilidade do estado estacionário*, aplicamos o critério de Routh-Hurwitz. Simplificando o determinante da matriz, introduzimos as novas variáveis, de modo que este se descreve como:

$$\frac{4}{\delta^2 G} \begin{vmatrix} -\kappa_1 - \Xi & -X & 0 \\ -\Xi & -X - \Omega - \Lambda & -\Phi \\ 0 & -\Lambda & -\Phi - \kappa_2 \end{vmatrix} \quad (15)$$

Abrindo os colchetes, e aplicando a condição $\text{Det } J < 0$, saliente do critério, obtemos o requisito de estabilidade do estado estacionário, descrito como:

$$-\kappa_1 (X\Phi + \Omega\Phi + X\kappa_2 + \Omega\kappa_2 + \Lambda\kappa_2) - \Xi(\Omega\Phi + \Omega\kappa_2 + \Lambda\kappa_2) < 0 \quad (16),$$

Requisito fácil de satisfazer, não havendo influências superficiais e eletroquímicas na dupla camada elétrica. Deveras, se não houver as influências supracitadas, os parâmetros X e Λ manter-se-ão positivos, e as expressões do lado esquerdo da inequação (16), deslocar-se-ão para valores mais negativos, e o estado estacionário far-se-á mais estável. A expressão (16) tem aparência de uma expressão, característica para um processo eletroanalítico, controlado por difusão do analito e da substância interferente.

Sem embargo, como se sói acontecer, neste sistema, a estabilidade do estado estacionário não garantirá a sua eficiência eletroanalítica. Decerto, havendo reação lateral rápida do composto fosfazoico da superfície do eléctrodo, o material modificador não poderá mais assistir o processo eletroanalítico, embora o estado estacionário permaneça estável. Assim sendo, faz-se um requisito específico de estabilidade relativa do composto fosfazoico em meio à reação lateral.

Satisfeito este requisito, a estabilidade do estado estacionário descreverá a linearidade da dependência entre o parâmetro eletroquímico e a concentração do analito e corresponder-se-lhe-á. Destarte, é possível concluir que, não havendo reações laterais rápidas, o fosfazocomposto da acridina será um modificador eficiente para a detecção do conteúdo do ácido gálico.

A *instabilidade monotônica* correspondente ao limite de detecção, neste sistema se realiza no caso da nulidade do determinante da matriz de Jacobi, e a sua condição de aparição é:

$$-\kappa_1 (X\Phi + \Omega\Phi + X\kappa_2 + \Omega\kappa_2 + \Lambda\kappa_2) - \Xi(\Omega\Phi + \Omega\kappa_2 + \Lambda\kappa_2) < 0 \quad (17)$$

Se a substância, presente na solução, não reagir com o fosfazocomposto, nem com o analito, considerar-se-á indiferente, e a variável s excluir-se-á do conjunto de equações diferenciais (1), e o conjunto transformar-se-á no descrito, por exemplo, em [15] e em [22].

Na alfarroba, não existem substâncias, capazes de provocar a modificação e dissolução do fosfazocomposto de acridina. Destarte, o seu uso é compatível com a análise do conteúdo de alfarroba em soluções neutras.

CONCLUSÕES

A avaliação teórica do comportamento do composto fosfazoico da acridina na detecção eletroquímica do conteúdo total do ácido gálico em alfarroba deixou concluir que:

- A estabilidade do estado estacionário é fácil de manter. O processo eletroanalítico é controlado pela difusão.
- Desde que não haja reações laterais rápidas, o estado estacionário estável manter-se-á eficiente do ponto de vista eletroanalítico e correspondente à dependência linear entre o parâmetro eletroquímico e a concentração do analito.
- O comportamento oscilatório, neste caso, é possível, sendo causado pelas influências da etapa eletroquímica na capacitância da dupla camada elétrica e, se for o caso, pelos efeitos superficiais da dissolução do composto fosfazoico.

CONFLITO DE INTERESSES

Os autores não tem conflitos de interesses.

REFERÊNCIAS

1. M. Kamal, E. Yousseff, M.M. El-Manfaloty, H.M. Ali, Assessment of proximate chemical composition, nutritional status, fatty acid composition and phenolic compounds of carob (*Ceratonia Siliqua L.*), *Food Publ. Health.*, **3**, 304 (2013).
2. R. Avallonne, M. Plessi, M. Baraldi, A. Monzan, Determination of chemical composition of carob (*Ceratonia siliqua*): protein, fat, carbohydrates, and tannins, *J. Food Comp. Anal.*, **10**, 166 (1997).
3. http://www.nlm.nih.gov/cgi/mesh/2006/MB_cgi?mode=&term=Propyl+-Gallate, acceso a los 7 de Febrero de 2015.

4. J. Widergen, A. Chmyrov, C. Eggeling *et al.*, Strategies to improve photostabilities in ultrasensitive fluorescence spectroscopy, *J. Phys. Chem.*, **111**, 429 (2007).
5. E. Ritzer, R. Sundermann, "Hydroxycarboxylic Acids, Aromatic", Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry (7th^{ed.}), Wiley, p. 6, 2007.
6. Final report on the amended safety assessment of propyl gallate, *Int. J. Toxicol.*, **26**, 89 (2007).
7. A. Adamasi, A. Mozzarelli, C. Meda *et al.*, Identification of xenoestrogens in food additives by an integrated in silico and in vitro approach, *Chem. Res. Toxicol.*, **22**, 52 (2009).
8. M. Debbab, S. El-Hajjaji, A.H. Aly *et al.*, Cypermethrin residues in fresh vegetables: Detection by HPLC and LC-ESIMS and their effect on antioxidant activity, *Mater. Environ. Sci.*, **5**, 2257 (2014).
9. A. Alnokkari, M. Ataie, M. Rajab, Z. Alassaf, Determination of propyl gallate in some vegetable oil samples by thin layer chromatography-image analysis method, *Int. J. Pharm., Sci.*, **26**, 268 (2014).
10. 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).
11. M. Lin, A dopamine electrochemical sensor based on gold nanoparticles/overoxidized polypyrrole nanotube composite arrays, *RSC Adv.*, **5**, 9848 (2015).
12. 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).
13. 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).
14. V.V. Tkach, Y.G. Ivanushko, S.M. Lukanova *et al.*, Avaliação teórica da detecção eletroquímica CoO(OH)-assistida de galatos em alfarroba, *TecnoAlimentar*, **12**, 50 (2017).
15. V.V. Tkach, Y.G. Ivanushko, S.M. Lukanova *et al.*, (9-triphenylphosphazo)acridine, Synthesis and theoretical modeling for electroanalytical action, *Appl. J. Env. Eng. Sci.*, **3**, 365 (2017).

16. I. Das, N. Goel, N.R. Agrawal, S.K. Gupta, Growth patterns of dendrimers and electric potential oscillations during electropolymerization of pyrrole using mono-and mixed surfactants, *J. Phys. Chem.*, **114**, 12888 (2010).
17. D. Sazou, The dynamical behavior of the electrochemical polymerization of indole on Fe in acetonitrile-water mixtures, *Synth. Met.*, **130**, 45 (2002).
18. I. Das, N.R. Agrawal, S.A. Ansari, S.K. Gupta, Pattern formation and oscillatory electropolymerization of thiophene, *Ind. J. Chem.*, **47**, 1798 (2008).
19. M. Bazzouai, E.A. Bazzouai, L. Martins, J.I. Martins, Electropolymerization of pyrrole on zinc-lead-silveralloys' electrodes in neutral and acid organic media, *Synth. Met.*, **130**, 73 (2002).
20. S.U. Rahman, M.S. Ba-Shammakh, Thermal effects on the process of electropolymerization of pyrrole on mild steel, *Synth. Met.*, **140**, 207 (2004).
21. M.S. Ba-Shammakh, "Electropolymerization of pyrrole on mild steel for corrosion protection", Ph. D. Thesis, King Fahd University of Petroleum and Minerals, Dharan, Saudi Arabia, 2002.
22. V.V. Tkach, V.V. Nechyporuk, P.I. Yagodynets', A investigação matemática do desempenho de biossensores eletroquímicos enzimáticos baseados nos polímeros condutores, *Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm.*, **41**, 203 (2012).
23. V.V. Tkach, Ya. G. Ivanushko, S.M. Lukanova *et al.*, The Theoretical Evaluation of the Possibility of Theacrine Electrichemical Detection over the Polymers of Quinonic Compounds, *Anal. Bioanal. Electrochem.*, **9**, 145 (2017).
24. V.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).

COMO CITAR ESTE ARTIGO

V.V. Tkach, M.V. Kushni, Y.G. Ivanushko, S.C. de Oliveira, M.P. Zavhorodnii, O.A. Brazhko, O.V. Luganska, O.V. Ahafonova, P.I. Yagodynets', A descrição matemática do desempenho do novo derivado acridínico na detecção eletroanalítica do conteúdo total do ácido gálico em alfarroba, *Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm.*, **47**(3), 441-451 (2018).

REV. COLOMB. CIENC. QUÍM. FARM.,
VOL. 47, NÚMEROS 1 A 3, 2018.

ÍNDICE GENERAL POR TIPO DE ARTÍCULOS

Artículos de investigación científica

- Actividad antibacteriana del extracto etanólico del peciolo de *Rheum rhabarbarum*
Nerlis Paola Pájaro, Clemente Granados Conde,
Miladys Esther Torrenegra Alarcón 26
- Caracterização química e citotoxicidade do óleo essencial do cravo-da-índia
(*Syzygium aromaticum*)
Paulo Roberto Barros Gomes, Victor Elias Mouchrek Filho,
Waléria Ferreira Rabêlo, Alexandre Albuquerque do Nascimento,
Hilton Costa Louzeiro, Wellington da Silva Lyra, Maria Alves Fontenele 37
- A detecção eletroquímica da lidocaína sobre o oxihidróxido de cobalto trivalente.
Uma possibilidade teórica a ser avaliada
Volodymyr V. Tkach, Yana G. Ivanushko, Svitlana M. Lukanova,
Marta V. Kushnir, Sílvio C. de Oliveira, Ana P. Alves, Reza Ojani,
Petró I. Yagodynets' 71
- A descrição matemática da análise eletroquímica do fármaco hidroxizina em
soluções ácidas sobre um ácido sulfônico, baseado num polímero condutor
Volodymyr V. Tkach, Yana G. Ivanushko, Svitlana M. Lukanova,
Lyudmyla V. Romaniv, Sílvio C. de Oliveira, Reza Ojani,
Olga V. Luganska, Petró I. Yagodynets' 121
- Preferential solvation of triclin in {ethanol (1) + water (2)} mixtures
at several temperatures
Juan José Sandoval-Castro, Claudia Patricia Ortiz,
Juan Diego Rodríguez-Rubiano, Gerson Andrés Rodríguez-Rodríguez,
Daniel Ricardo Delgado 135
- Synthesis and physicochemical studies of vanillin chalcones
Shipra Baluja, Nayan Vakariya, Asmita Hirapara 185

Agentes dopaminérgicos centrales análogos *N*-aralquil metoxilados del 2-aminoindano

Geraldine Suárez Bozo, María Sanguino Díaz, Gerardo Lucena, Miriam Ocampo Hernández, Lucía Rodríguez Villasmil, Katherin Balza Jiménez, Mariagracia Vera Sosa, Ligia Ángel Migliore, Biagina Migliore de Ángel, Jaime Charris Charris, Anita Israel, Simón López D' Sola, Rodolfo Izquierdo, José Caldera Luzardo, José Ortega Fernández, María Ramírez Morán, Jorge Ángel Guío

233

Frequency of 14 genetic variants associated with breast cancer risk and treatment in a Colombian population

Yeimy Viviana Ariza Márquez, Fabio Ancízar Aristizábal Gutiérrez, Alberto Gómez-Gutiérrez, Piedad Elena Gómez, María Consuelo Casas Gómez, Ignacio Briceño Balcázar

277

Evaluación teórica del desempeño del electrodo, modificado por el oxihidróxido de cobalto (III) en la detección del ácido úrico

Volodymyr V. Tkach, Yana G. Ivanushko, Svitlana M. Lukanova, Marta V. Kushnir, Sílvio C. de Oliveira, Reza Ojani, Olga V. Luganska, Petró I. Yagodynets'

289

Avaliação teórica do uso do oxihidróxido de vanádio trivalente na detecção eletroquímica de nandrolona

Volodymyr V. Tkach, Yana G. Ivanushko, Svitlana M. Lukanova, Sílvio C. de Oliveira, Fauze J. Anaissi, Nataliia M. Storoshchuk, Petro I. Yagodynets'

400

A descrição matemática do desempenho do novo derivado acridínico na detecção eletroanalítica do conteúdo total do ácido gálico em alfarroba

Volodymyr V. Tkach, Marta V. Kushnir, Yana G. Ivanushko, Sílvio C. de Oliveira, Mykhailo P. Zavorodnii, Oleksandr A. Brazhko, Olga V. Luganska, Oleksandra V. Ahafonova, Petró I. Yagodynets'

441

Artículos de investigación tecnológica

Determinación de metales pesados en humos metálicos en ambientes informales de trabajo dedicados a la soldadura

Jorge Puello Silva, Glicerio León Méndez, Diana Gómez Marrugo, Heidi Muñoz Monroy, Loraine Blanco Herrera

4

- Evaluación del impacto ambiental del proceso de modificación química de almidones nativos como potenciales excipientes en la industria cosmética
Melissa Soledad Caro Soto, Miladys Esther Torrenegra Alarcón,
María del Rosario Osorio Fortich, Glicerio León Méndez, Nerlis Paola Pajaro 217
- Acetilación del almidón de millo (*Pennisetum glaucum*) y evaluación de su aplicación como posible excipiente
Alexander Sulbarán, Germán E. Matiz, Yolima Baena 255
- Avaliação do teor de vitamina C de preparados sólidos para refresco comercializados em Campo Grande-MS
Meyliane Fabiana Rosa, Aline Marques Rosa, Rúbia Adrieli Sversut,
Marcos Serrou do Amaral, Nájla Mohamad Kassab 339
- Extracción y encapsulación de compuestos fenólicos provenientes de cascarilla de arroz
Deisy Sánchez-Molina, Mayra Vargas-Porras, Rodrigo Ortega-Toro,
Yineth Piñeros-Castro 410
- Validación de una metodología analítica por HPLC-DAD para la cuantificación de ácido benzoico complejado, en un ensayo de permeación transdérmica in vitro empleando piel de cerdo
Laura A. Martínez, Jorge A. Martínez, Yolima Baena 424
- Artículos de investigación clínica**
- Polifarmacia en especies menores de clínicas veterinarias de la provincia de Heredia, en Costa Rica
Ramsés Alfaro-Mora, Mariana Loria-Granados, Dylan Camacho-Bogantes 5
- Cualificación y experiencia de los vendedores de droguería para la dispensación de amoxicilina en una comuna de Santiago de Cali, Colombia
Jobany Castro Espinosa, Luis Fernando Molineros 53
- Prescripción de analgésicos y reacciones adversas en pacientes hospitalizados
Álvaro Vallejos Narváez, Juan Camilo Calvache, María Paula Ávila,
Sergio Iván Latorre, Camilo Andrés Ruano, Jennifer Delgadillo,
Helman Esteban Hernández, Gina Paola Manosalva,
Sindy Carolina Malaver, Paula Alejandra Torres, Guillermo Eduardo Bernal,
Andrea Tovar, Laura Marcela Caicedo 86

Percepción de usuarios de Cali-Colombia acerca de medicamentos genéricos Camilo Torres Serna, David Altman Salcedo, Luisa María Fernández Rodríguez, Luis Orozco Idrobo, Rodrigo A. Rosero Alayón	151
Evaluación de la publicidad de medicamentos y suplementos dietarios en un canal de televisión dentro de la franja horaria central Angélica Andrea González-Acuña, Laura Dennis Vargas-Zapata, José Julián López-Gutiérrez	169
Artículos de revisión	
Desarrollo de vectores génicos basados en polímeros sintéticos: PEI y PDMAEMA Ivonne Lorena Díaz Ariza, César Augusto Sierra, León Darío Pérez Pérez	350
Potenciales candidatos antimaláricos y antiplasmodiales de origen natural y sintético Ana María Mesa-Vanegas	375

ÍNDICE GENERAL DE AUTORES

Ahafonova, Oleksandra V	441	Hirapara, Asmita	185
Albuquerque do Nascimento, Alexandre	37	Israel, Anita	233
Alfaro-Mora, Ramsés	5	Ivanushko, Yana G.	71, 121, 289, 400, 441
Altman-Salcedo, David	151	Izquierdo, Rodolfo	233
Alves, Ana P.	71	Kassab, Nájla Mohamad	339
Alves-Fontenele, Maria	37	Kushnir, Marta V.	71, 289, 441
Anaissi, Fauze J.	400	Latorre, Sergio Iván	86
Ángel-Migliore, Ligia	233	León-Méndez, Glicerio	14, 217
Aristizábal-Gutiérrez, Fabio Ancízar	277	López-D' Sola, Simón	233
Ariza-Márquez, Yeimy Viviana	277	López-Gutiérrez, José Julián	169
Ávila, María Paula	86	Loria-Granados, Mariana	5
Baena, Yolima	255, 424	Lucena, Gerardo	233
Baluja, Shipra	185	Luganska, Olga V.	121, 289, 441
Balza-Jiménez, Katherin	233	Lukanova, Svitlana M.	71, 121, 289, 400
Barros-Gomes, Paulo Roberto	37	Malaver, Sindy Carolina	86
Bernal, Guillermo Eduardo	86	Manosalva, Gina Paola	86
Blanco-Herrera, Loraine	14	Marques-Rosa, Aline	339
Brazhko, Oleksandr A.	441	Martínez, Jorge A.	424
Briceño-Balcázar, Ignacio	277	Martínez, Laura A.	424
Caicedo, Laura Marcela	86	Matiz, Germán E.	255
Caldera-Luzardo, José	233	Mesa-Vanegas, Ana María	375
Calvache, Juan Camilo	86	Migliore de Ángel, Biagina	233
Camacho-Bogantes, Dylan	5	Molineros, Luis Fernando	53
Caro-Soto, Melissa Soledad	217	Mouchrek-Filho, Victor Elias	37
Casas-Gómez, María Consuelo	277	Muñoz-Monroy, Heidi	14
Castro-Espinosa, Jobany	53	Ocampo-Hernández, Miriam	233
Charris-Charris, Jaime	233	Ojani, Reza	71, 121, 289
Costa-Louzeiro, Hilton	37	Orozco-Idrobo, Luis	151
Da Silva Lyra, Wellington	37	Ortega-Fernández, José	233
De Oliveira, Sílvio C.	71, 121, 289, 400, 441	Ortega-Toro, Rodrigo	410
Delgadillo, Jennifer	86	Ortiz, Claudia Patricia	135
Delgado, Daniel Ricardo	135	Osorio-Fortich, María del Rosario	217
Díaz-Ariza, Ivonne Lorena	350	Pájaro, Nerlis Paola	26, 217
Fernández-Rodríguez, Luisa María	151	Pérez-Pérez, León Darío	350
Ferreira-Rabêlo, Wáléria	37	Piñeros-Castro, Yineth	410
Gómez, Piedad Elena	277	Puello-Silva, Jorge	14
Gómez-Gutiérrez, Alberto	277	Ramírez-Morán, María	233
Gómez-Marrugo, Diana	14	Rodríguez-Rodríguez, Gerson Andrés	135
González-Acuña, Angélica Andrea	169	Rodríguez-Rubiano, Juan Diego	135
Granados-Conde, Clemente	26	Rodríguez-Villasmil, Lucía	233
Guío, Jorge Ángel	233	Romaniv, Lyudmyla V.	121
Hernández, Helman Esteban	86	Rosa, Meyliane Fabiana	339

Rosero-Alayón, Rodrigo A.	151	Torrenegra-Alarcón, Miladys Esther	26, 217
Ruano, Camilo Andrés	86	Torres, Paula Alejandra	86
Sánchez-Molina, Deisy	410	Torres-Serna, Camilo	151
Sandoval-Castro, Juan José	135	Tovar, Andrea	86
Sanguino-Díaz, María	233	Vakariya, Nayan	185
Serrou do Amaral, Marcos	339	Vallejos-Narváez, Álvaro	86
Sierra, César Augusto	350	Vargas-Porras, Mayra	410
Storoshchuk, Nataliia M.	400	Vargas-Zapata, Laura Dennis	169
Suárez-Bozo, Geraldine	233	Vera-Sosa, Mariagracia	233
Sulbarán, Alexander	255	Yagodynets', Petró I.	71, 121, 289, 400, 441
Sversut, Rúbía Adrieli	339	Zavhorodnii, Mykhailo P.	441
Tkach, Volodymyr V.	71, 121, 289, 400, 441		

ÍNDICE ANALÍTICO DE TÉRMINOS

Español

Acetilación	255	Interacción farmacología	5
Ácido benzoico	424	Liofilización	410
Ácido úrico	289	Malaria	375
Actividad antibacteriana	27	Maltodextrina	410
Actividad antioxidante	410	Medicamentos fraudulentos	151
Agonistas dopaminérgicos	234	Medicamentos genéricos	151
Almidón	218	Medicamentos innovadores	151
Almidones modificados	255	Metales pesados	15
Amoxicilina	53	N,N-dimetil formamida	186
Analgésico	87	N-aralquil, aminoindano	234
Antibiótico	53	Oxihidróxido de cobalto (III)	289
Antimalárico	375	Pacientes hospitalizados	87
Cáncer de mama	279	<i>Pennisetum glaucum</i>	255
Caninos	5	Permeabilidad	424
Celdas de Franz	424	Piel de cerdo	424
Chalconas	186	<i>Plasmodium</i>	375
Cloroformo	186	Población animal	5
Coefficiente de reparto	186	Polietileneimina	350
Colombia	279	Polifarmacia	5
Compuestos fenólicos	410	Polimetacrilato de N, N-dimetilaminoetilo	350
Conductancia	186	Prescripción de medicamentos	151
Copolímeros anfífilicos	350	Propiedades acústicas	186
Cosmética	218	Quimioterapia	375
Diclofenaco	87	Resistencia	356, 375
Dipirona	87	<i>Rheum rhabarbarum</i>	27
Dispensación	53	Salud	15
Droguería	53	Seguridad ocupacional	15
Electrodos químicamente modificados	289	Sensores electroquímicos	289
Enfermedad de Huntington	234	Síntesis	186
Enfermedad de Parkinson	234	Soldadura	15
Estado estacionario estable	289	Solvatación preferencial	136
Etanol	136	Subproducto	410
Extracto etanólico	27	Terapia génica	350
Farmacogenómica	279	Tramadol	87
HPLC-DAD	424	Tricina	136
Huella de carbono	218	Validación	424
IKBI	136	Vectores poliméricos	350
Impacto ambiental	218	Veterinaria	5
Índice de refracción	186	<i>Zea mays</i>	255

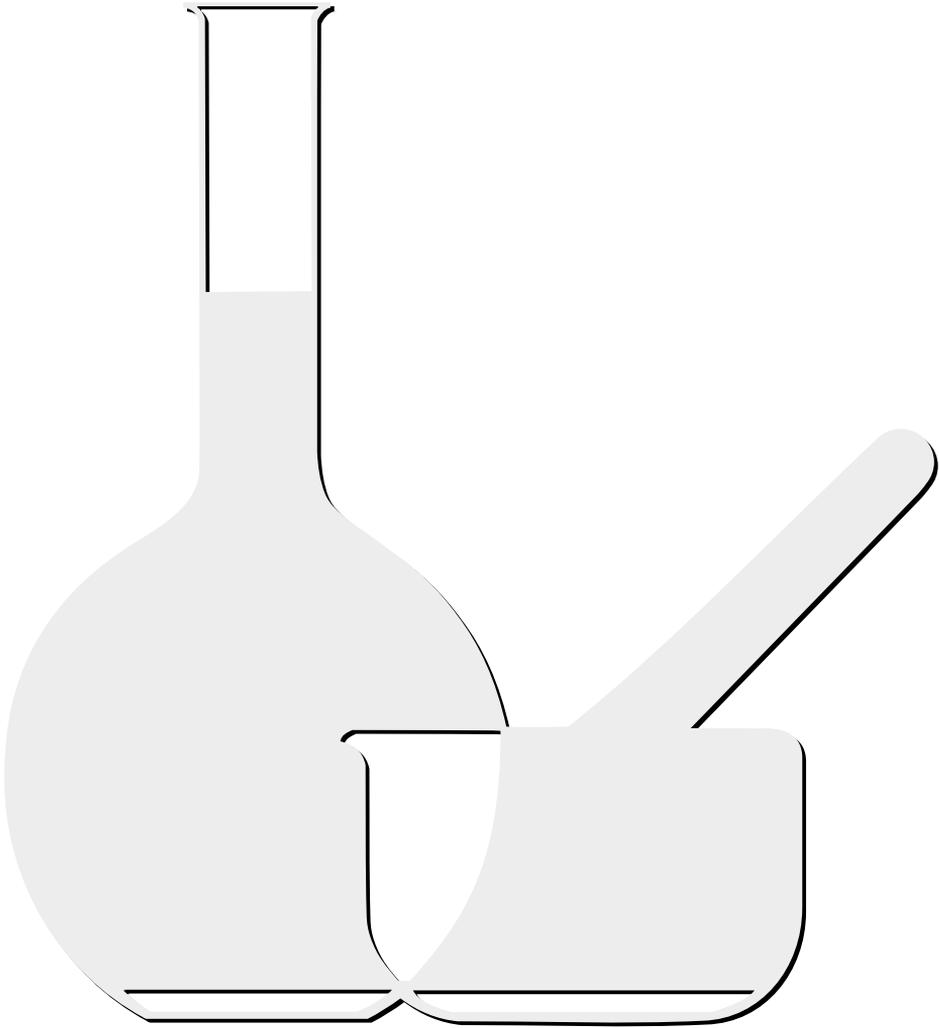
Inglés

Acetylation	255	Gallic acid	411, 441
Acoustical properties	185	Gene therapy	351
Activity antibacterial	27	Generic drugs	152
Amoxicillin	54	Health	15
Amphiphilic copolymers	351	Heavy metals	15
Analgesics	87	HPLC-DAD	425
Animal population	6	Huntington's disease	234
Antibiotic	54	Hydrodistillation	38
Antimalarial	376	Hydroxyzine	122
Antioxidant activity	411	IKBI	135
Benzoic acid	425	Innovative drugs	152
Breast Cancer	278	Inpatients	87
By-product	411	Lidocaine	72
Canine	6	Malaria	376
Carbon footprint	218	Maltodextrin	410
Carob	442	Medication security	72
Cathodic electrochemical reduction	401	Metamizole	87
Chalcones	185	N, N-dimethyl formamide	185
Chemically modified electrodes	72, 290, 401, 442	Nandrolone	401
Chemotherapy	376	N-aralkyl, aminoindane	234
Chloroform	185	Occupational safety	15
Cobalt (III) oxyhydroxide	72, 290	Parkinson's disease	234
Colombia	278	Partition coefficient	185
Conductance	185	<i>Pennisetum glaucum</i>	255
Conducting polymers	122	Permeability	424
Content determination	340	Pharmacogenomics	278
Cosmetics	218	Phenolic compounds	410
Diclofenac	87	Physical-chemical evaluation	38
Dietary supplements	170	<i>Plasmodium</i>	375
Dispensation	54	Poly (N, N-dimethylaminoethyl methacrylate)	350
Dopaminergic agonists	234	Polyethyleneimine	350
Drug interaction	6	Polymeric vectors	351
Drug Publicity	170	Polypharmacy	6
Drugstore	54	Porcine skin	425
Electrochemical sensors	122, 290, 442	Preferential solvation	135
Environmental impact	218	Prescription drugs	152
Ethanol	135	Quality control	340
Eugenol	38	Refractive index	185
Extract ethanolic	27	Resistance	376
Floral buds	38	<i>Rheum rhubarbarum</i>	27
Franz cells	425	Stable steady-state	72, 122, 290, 401, 442
Fraudulent drugs	152	Starch	218
Freeze-drying	411	Starch	255

Sulfonic acids	122	Validation	425
Synthesis	185	Vanadium (III) oxyhydroxide	401
<i>Syzygium aromaticum</i>	38	Veterinary	6
Television	170	Vitamin C	340
Titrimetry	340	Welding	15
Tramadol	87	WHO	170
Tricin	135	<i>Zea mays</i>	255
Uric acid	290		

Portugués

Ácido gálico	441	Hidroxizina	121
Ácidos sulfônicos	121	Lidocaína	71
Alfarroba	441	Nandrolona	400
Avaliação físico-química	38	Oxihidróxido de cobalto	71
Botões florais	38	Oxihidróxido de vanádio (III)	400
Controle de qualidade	339	Polímeros condutores	121
Determinação do teor	339	Segurança de medicação	71
Elétrodos quimicamente modificados	71, 400, 441	Sensores eletroquímicos	121, 441
Eletrorredução catódica	400	<i>Syzygium aromaticum</i>	38
Estado estacionário estável	71, 121, 400, 441	Titulometria	339
Eugenol	38	Vitamina C	339
Hidrodestilação	38		



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 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, al correo electrónico rcciquifa_fcbog@unal.edu.co o a través del sistema OJS en el sitio web: <https://revistas.unal.edu.co/index.php/rcciquifa>.

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 este 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.

Criterios para la presentación de manuscritos

- La fuente de los manuscritos debe ser Times New Roman tamaño 12.
- No se admiten notas a pie de página.
- Título, centrado y en minúscula.
- Autor(es) con su respectiva filiación institucional y correo electrónico del autor principal.
- Resumen, *Summary* o Resumen. Incluye la justificación del estudio y los principales hallazgos y conclusiones, debe tener entre 50 y 200 palabras. Se debe incluir el título del artículo y el resumen en inglés (*Summary*) independiente del idioma del manuscrito.
- *Key words* (debajo de *Summary*) y Palabras clave (debajo del Resumen) o Palabras chave (debajo de Resumen). 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>).

- En los manuscritos en español y portugués se empleará la coma (,) como separador decimal, en inglés se utilizará el punto (.).
- Los artículos se dividirán en las siguientes secciones: Introducción, Metodología, Resultados y Discusión, Conclusiones (si las hay), Agradecimientos, Conflicto de intereses 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 las figuras.

De otro lado, los artículos relacionados con experimentación con animales deben ajustarse plenamente a los lineamientos éticos trazados por la Organización Mundial de la Salud. Los extractos o fracciones evaluados *in vitro* o *in vivo* deben definirse químicamente, cuando menos en cuanto a la

clase de constituyente. El material vegetal deberá estar clasificado botánicamente.

Las abreviaturas de pesos y medidas serán las indicadas por la Farmacopea de los Estados Unidos en su edición oficial o unidades SI. Los datos espectroscópicos se deben presentar de la siguiente manera:

UV λ max (solvente ϵ) nm (log ϵ). Ej.: UV λ max (MeOH) 275 (log ϵ 2,94).

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

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

RMN ^1H (solvente, frecuencia de registro) δ ppm (integración, multiplicidad, J en Hz, asignación). Ej.: RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) 3,84 (1H, *d*, J = 10,3 Hz, H-30).

RMN ^{13}C (solvente, frecuencia de registro) δ ppm (multiplicidad, asignación). Ej.: RMN ^{13}C (CDCl_3 , 600 MHz) 16,60 (t, C-12).

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

Las abreviaturas para los solventes y reactivos más comúnmente usados son: EtOH = etanol, MeOH = metanol, CHCl_3 = cloroformo, C_6H_6 = benceno, AcOEt = acetato de etilo, EP = éter de petróleo, Me_2CO = acetona, DMSO = dimetilsulfóxido, AcOH = ácido acético.

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

Referencias de los manuscritos

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, así:

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. El nombre de la revista debe ir 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: 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: Iniciales del nombre y apellido completo de los autores, *título en cursiva*, Tesis de..., institución, ciudad, año, páginas. Ej.:

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

Referencias de Internet: Iniciales 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 puede enviarse a la siguiente dirección o al correo de la revista rcciquifa_fcbog@unal.edu.co

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>

Revista Colombiana
de Ciencias Químico-Farmacéuticas, 47(3)
se terminó de editar, imprimir y encuadernar
en Proceditor, sobre papel bond de 90 gramos
Bogotá, D. C., Colombia.



